



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111194222 A

(43)申请公布日 2020.05.22

(21)申请号 201880028741.7

(22)申请日 2018.04.30

(30)优先权数据

62/492,912 2017.05.01 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.10.30

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/030276 2018.04.30

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/204278 EN 2018.11.08

(71)申请人 阿吉尔瓦克斯公司

地址 美国新墨西哥州

(72)发明人 费德丽卡·佩里克莱

约翰·奥罗克 费德丽卡·卡瓦洛

(74)专利代理机构 北京柏杉松知识产权代理事务
所(普通合伙) 11413

代理人 王春伟 刘继富

(51)Int.Cl.

A61K 39/395(2006.01)

C07K 16/46(2006.01)

C07K 16/30(2006.01)

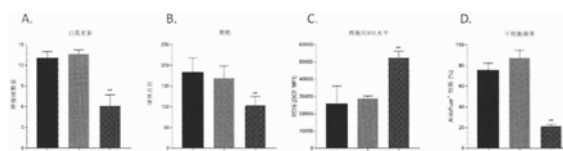
权利要求书1页 说明书26页
序列表13页 附图14页

(54)发明名称

与xCT抗体相关的组合物和方法

(57)摘要

一些实施方案涉及具有xCT特异性抗体的治疗组合物。



1. 一种xCT抗体,其特异性结合由氨基酸序列SEQ ID NO:4定义的表位。
2. 根据权利要求1所述的抗体,其中所述xCT抗体的重链包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:15的CDR1、具有氨基酸序列SEQ ID NO:16的CDR2和具有氨基酸序列SEQ ID NO:17的CDR3。
3. 根据权利要求1所述的抗体,其中所述xCT抗体的轻链包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:20的CDR1、具有氨基酸序列SEQ ID NO:21的CDR2和具有氨基酸序列SEQ ID NO:22的CDR3。
4. 根据权利要求1所述的抗体,其中所述xCT抗体包含重链和轻链,所述重链包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:15的CDR1、具有氨基酸序列SEQ ID NO:16的CDR2和具有氨基酸序列SEQ ID NO:17的CDR3;所述轻链包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:20的CDR1、具有氨基酸序列SEQ ID NO:21的CDR2和具有氨基酸序列SEQ ID NO:22的CDR3。
5. 根据权利要求1所述的抗体,其中所述抗体或抗体片段是人源化的。
6. 根据权利要求1所述的抗体,其中所述抗体或抗体片段是嵌合的。
7. 根据权利要求1所述的抗体,其中所述抗体是抗体片段。
8. 根据权利要求7所述的抗体,其中所述抗体片段是ScFv。
9. 根据权利要求8所述的抗体,其中所述ScFv是鼠的或人源化的。
10. 治疗胰腺癌、胃肠道癌、肺癌、乳腺癌、宫颈癌、子宫癌、卵巢癌、结肠直肠癌或胃癌的方法,其包括施用有效量的权利要求1的抗xCT抗体、或结合xCT的抗体片段。
11. 根据权利要求10所述的方法,其中所述抗体或抗体片段是人源化的。
12. 根据权利要求10所述的方法,其中所述抗体或抗体片段是嵌合的。
13. 根据权利要求10所述的方法,其中所述抗体或抗体片段是抗体片段,且所述抗体片段是ScFv。
14. 根据权利要求13所述的方法,其中ScFv是鼠的或人源化的。
15. 根据权利要求10所述的方法,其中所述患者是人或非人动物。
16. 根据权利要求10所述的方法,其中所述抗体或抗体片段是肠胃外、腹膜内、静脉内、皮下、经口、经鼻、经吸入或经直肠施用的。
17. 根据权利要求10所述的方法,其中所述抗体或抗体片段以 $5\text{mg}/\text{m}^2$ 至 $2000\text{mg}/\text{m}^2$ 的剂量静脉内施用。

与xCT抗体相关的组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2017年5月1日提交的美国临时专利申请第62/492912号的优先权,其整体内容通过引用并入此文。

背景技术

[0003] 三阴性乳腺癌 (TNBC) 是一种侵袭性的乳腺癌,其缺乏雌激素、孕激素和HER2受体,且在美国占有所有乳腺癌的15%至20%。TNBC比其他形式的乳腺癌具有更高的复发率和更差的预后,并且由于缺乏可靶向的表面受体,TNBC对激素和靶向HER2的疗法具有抵抗力。TNBC的特别具有侵略性的特征可能是由于癌症干细胞 (CSC) 的富集,癌症干细胞具有维持和扩散肿瘤所必需的独特生物学特性,并且通过不对称分裂可以分化为组成肿瘤块的癌细胞 (Magee等人,Cancer Cell 2012,21 (3):283-96)。由于它们对常规放射疗法和化学疗法具有抵抗力 (Nagano等人,Oncogene 2013,32 (44):5191-8),CSC代表了治疗后疾病复发、转移性演变和疾病进展的蓄积库。因此,成功根除CSC代表了有效癌症治疗的主要障碍。

[0004] CSC抵抗常见细胞毒性疗法的能力取决于不同的机制,包括改善的解毒能力。胱氨酸-谷氨酸逆转运蛋白xCT (SLC7A11) 调节半胱氨酸的摄入、向半胱氨酸的转化以及随后的谷胱甘肽合成、通过p38^{MAPK}途径保护细胞免受氧化和化学损伤 (Chen等人,Oncogene 2009,28 (4):599-609;Guo等人,Cancer Lett.2011,312 (1):55-61)。xCT的表达高度受限于少数几种正常细胞类型 (神经元和巨噬细胞的子集),但是在包括TNBC的大量侵袭性乳腺导管肿瘤中观察到xCT蛋白的水平升高 (Lanzardo等人Cancer Res.2016,76 (1):62-72)。高水平的xCT mRNA和蛋白与显著降低的无远端转移和总体生存率相关 (Briggs等人,Cell 2016,166 (1):126-39;Gyorffy等人,Breast Cancer Res Treat.2010,123 (3):725-31)。xCT在乳腺癌CSC (BCSC) 和其他实体瘤干细胞中的表达上调,并且一些研究表明xCT与众所周知的干细胞标志物CD44发生物理相互作用 (Nagano等人,Oncogene 2013,32 (44):5191-8;Hasegawa等人,Oncotarget 2016,7 (11):11756-69;Ishimoto等人,Cancer Cell 2011,19 (3):387-400;Ju等人,Mechanisms and Therapeutic Implications.Theranostics 2016,6 (8):1160-75;Yoshikawa等人,Cancer Res.2013,73 (6):1855-66)。多种CSC上xCT表达的频率表明,靶向xCT的疗法可能对包括胃肠道癌和胰腺癌的具有高干细胞频率的多种肿瘤有效。

[0005] 通过小分子柳氮磺胺吡啶 (SASP) 抑制xCT功能显示了xCT在乳腺癌转移中的直接作用,这导致动物模型中转移灶的显著减少和CSC频率的降低 (Nagano等人,Oncogene 2013,32 (44):5191-8;Chen等人,Oncogene 2009,28 (4):599-609;Guan等人,Cancer Chemother Pharmacol.2009,64 (3):463-72;Timmerman等人,Cancer Cell 2013,24 (4):450-65)。然而,SASP在生理条件下不稳定且不溶,具有巨大的脱靶效应、低的生物利用度,且需要高剂量才能在体内抑制xCT (Timmerman等人,Cancer Cell 2013,24 (4):450-65;Shitara等人,Gastric Cancer 2016;Linares等人,Expert Opin Drug Saf.2011,10 (2):253-63;Robe等人,BMC Cancer 2009,9:372)。因此,需要开发专门针对xCT的新治疗方法以用于临床用途。

发明内容

[0006] 一些实施方案涉及特异性结合xCT表位的治疗性抗体和单克隆抗体。一些方面涉及针对xCT肽和/或表位的单克隆抗体(MAB),包括但不限于存在于胞外域(ECD)1、2、3、4、6或其各种组合中的肽或表位。在一些情况下,可以使用基于VLP的疫苗接种来制备MAB。展示各种xCT肽的此类VLP可用于诱导可用于制备MAB的表位特异性免疫应答。

[0007] 在一些方面,肽或表位定义为SPKGV LQNTG (SEQ ID NO:2)、RPAATAVISLAFGRYILEPFFIQC (SEQ ID NO:3)、MQLIKGQTQNFKDAFSGRDSSITR (SEQ ID NO:4)、AYFTTINAEELLLSNAVAVTFSERLLGNFSL (SEQ ID NO:5)、YSDPFS (SEQ ID NO:6)、SPKGV LQNTG SVGMSLTIWT (SEQ ID NO:7)、ILEPFFIQC EIP EL (SEQ ID NO:8)、KGQTQNFKDAFSGRDSSITRLP (SEQ ID NO:9)、YFTTINAEELLLSNAVAVTFSERLLG (SEQ ID NO:10)、GDLDSL LN (SEQ ID NO:11) 和LYSDPFST (SEQ ID NO:12)。其他实施方案涉及特异性结合具有SEQ ID NO:2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12中的3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个或多于12个连续的氨基酸的肽的抗体。

[0008] 本发明提供了特异性结合xCT或xCT的ECD的高亲和力抗体和抗体片段。如本文所使用的,术语抗体指本领域公认的全长、完整的抗体分子。在本申请的上下文中,术语片段指抗体的一部分,其保留以高亲和力和特异性结合xCT、xCT肽或xCT表位的能力。可以基于原始全域结构中包含的和/或从原始全域结构中排除的域数量来定义抗体片段。因此,片段可以表示可变重链(VH)或可变轻链(VL)或单链Fv(VH-VL)或Fab(VL-CL-VH-CH1)或Fab2(VL-CL-VH-CH1)2或与抗癌部分(例如,化学疗法或放射疗法)、小分子、PEG、其他蛋白结构域或标记剂连接的上述任何一种。这些片段的优选实例是单链抗体可变区片段(ScFv)。除非另有说明,否则本申请中使用的术语抗体通常指完整的抗体分子或片段。可以使用抗体或非抗体框架或支架上存在的互补决定区(CDR)的氨基酸序列对其他xCT结合部分进行工程改造。

[0009] 抗体优选是人抗体、人源化抗体、嵌合抗体或ScFv抗体或片段。还提供本发明的抗体和片段作为用于治疗用途的药物制剂。本发明还提供了编码本发明的xCT抗体的重组DNA分子和用于重组制备或生产抗体的表达系统。

[0010] 本发明的xCT结合剂(例如抗xCT抗体)可用于治疗xCT过表达的疾病,例如癌症。抗体可以通过在细胞表面的特异性高亲和力相互作用来诱导细胞凋亡,并通过抗体依赖性细胞毒性(ADCC)和补体依赖性细胞毒性(CDC)杀死细胞。

[0011] 一些实施方案涉及xCT抗体,其特异性结合由SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12的氨基酸序列限定的表位,在一些方面是由SEQ ID NO:4的氨基酸序列限定的表位。在一些方面,xCT抗体的重链包含具有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的CDR3。在另一方面,xCT抗体包含轻链,该轻链包含具有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的CDR1,具有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:22的氨基酸序列的CDR3。抗体可以包含重链和轻链,该重链包含具有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的CDR3;该轻链包含具有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:22的氨基酸序列的CDR3。在一些方面,抗体或抗体片段是人的或人源化的。在其他方面,抗体或其抗体片段是嵌合

的。抗体可以是抗体片段。在一些方面,抗体片段是ScFv。ScFv可以是鼠的、人的或人源化的。

[0012] 本发明提供了向患有xCT过表达的疾病例如癌症的患者施用有效量的抗xCT抗体的治疗方法。xCT过表达的癌症包括胃肠道癌,包括大肠癌、胰腺癌、胃癌和其他癌症;肺癌;乳腺癌;白血病,包括急性骨髓性白血病;女性生殖癌,例如宫颈癌、子宫癌和卵巢癌;其他上皮癌,例如脑癌、前列腺癌、肝癌和肾癌。本发明的特定方面涉及可以促进癌细胞凋亡并且可以用于治疗适应症的抗xCT单克隆抗体。

[0013] 本发明提供了一种治疗癌症的方法,该方法包括向需要其的患者施用有效量的抗xCT抗体或抗体片段。

[0014] 在一个实施方案中,抗体或抗体片段是人源化的。在特定的实施方案中,抗体是单克隆抗体或抗体片段。在另一个实施方案中,抗体或抗体片段是嵌合的。在另一个实施方案中,抗体或抗体片段是ScFv。在另一个实施方案中,ScFv是人的、鼠的或人源化的。

[0015] 在一个实施方案中,癌症选自以下的至少一种:胃肠道癌、肺癌、乳腺癌、白血病、宫颈癌、子宫癌、卵巢癌、脑癌、前列腺癌、肝癌和肾癌。在另一个实施方案中,患者是人或非人类动物。在另一个实施方案中,经肠胃外、经腹膜内、经静脉内或经皮下、经口、经鼻、经吸入、经直肠施用抗体或抗体片段。在另一个实施方案中,以5mg/m²至2000mg/m²的剂量静脉内施用抗体或抗体片段。

[0016] 本发明还提供了在表达xCT的细胞中诱导细胞凋亡的方法,该方法包括使细胞与有效量的抗xCT抗体或抗体片段接触。在一些方面,靶向的细胞是癌细胞。

[0017] 本发明还提供了人源化鼠抗xCT抗体或抗体片段。在一个优选的实施方案中,抗体或抗体片段包含特异性结合本文所述的表位的单克隆抗体的CDR。在另一个实施方案中,用PEG修饰抗体或抗体片段。本发明还提供了抗xCT ScFv。在一个优选的实施方案中,ScFv包含特异性结合本文所述的表位的单克隆抗体的CDR。在另一个实施方案中,用PEG修饰ScFv。本发明还提供了对xCT具有高亲和力的抗xCT抗体的片段。在一个优选的实施方案中,该片段含有特异性结合本文所述的表位的单克隆抗体的CDR。在另一个实施方案中,用PEG修饰片段。

[0018] 本发明还提供了缀合物,其中上述抗体或片段与至少一个其他部分缀合。在一些方面,该部分是化学疗法标记、放射疗法标记或可检测的标记。

[0019] 本发明还提供了药物组合物,其包含如上所述的抗体或片段和至少一种药物赋形剂。在本发明的一个实施方案中,赋形剂是水、pH缓冲剂、润湿剂、盐、还原剂、糖、甘油、二醇、油、防腐剂和抗微生物剂中的一种或多于一种。

[0020] 一些实施方案涉及结合xCT肽或表位的治疗性抗体。在一些方面,制备展示或编码一种或多于一种xCT肽或表位的VLP或质粒。全长xCT蛋白可以具有与氨基酸序列MVRKPVVS TISKGGYLQGNVNGRLPSLGNKEPPGQEKVQLKRKVTLLRGVSIIIGTIIGAGIFISPKGVLQNTGSVGMSLTIWT VCGVLSLFGALSYAELGTTIKKSGGHYTYILEVFGPLPAFVRVWVELLIIRPAATAVISLAFGRYILEPFFIQCEI PELA IKLITAVGITVVMVLNSMSVSWSARIQIFLTFCKLTAILIIIVPGVMQLIKGQTQNFKDAFSGRDSSITRLP LAFYYGMYAYAGWFYLN FVTEEEVENPEKTIPLAICISMAIVTIGYVL TNVAYFTTINAEELLSNAVAVTFSERLL GNFS LAVPIFVALSCFGSMNGGVFAVSRLFYVASREGHLPEILSMIHVRKHTPLPAVIVLHPLTMIMLFSGDLDSL LNFLSFARWLFIGLAVAGLIYLRKCPDMHRPFKVPLFIPALFSFTCLFMVALSLYSDPFSTGIGFVITLTGVPAY

YLFIIWDKKPRWFRIMSEKITRTLQIILEVVPPEEDKL (SEQ ID NO:1) 的98%至100%一致性的氨基酸序列。xCT肽可以是SEQ ID NO:1的任何5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个或30个连续的氨基酸片段的任何氨基酸或编码其的核酸。在其他实施方案中,xCT蛋白可以具有变体氨基酸,其中xCT蛋白可以与SEQ ID NO:1中提供的氨基酸序列的85%、90%、95%或98%相同。在其他方面,xCT蛋白可包含SEQ ID NO:1的20个、30个、40个、50个、60个、70个、80个、90个、100个、150个、200个、250个、300个、350个、400个、450个、500个或501个连续的氨基酸,包括其间的所有值和范围,或与SEQ ID NO:1具有85%、90%、95%、98%或99%一致性的相同长度的肽。

[0021] 在一些方面,可以使用展示异源肽的RNA噬菌体外壳蛋白通过病毒样颗粒(VLP)来展示或编码免疫原性肽。构建VLP表达质粒以展示人xCT的细胞外结构域(ECD)或其他肽或表位。在一些方面,可以使用遗传插入和/或化学缀合方法将ECD或其他xCT肽展示在VLP的表面上。在一些方面,人xCT ECD的氨基酸序列是对应于SEQ ID NO:1的65位至74位氨基酸的ECD 1;和对应于SEQ ID NO:1的135位至158位氨基酸的ECD 2;对应于SEQ ID NO:1的211位至234位氨基酸的ECD 3;对应于SEQ ID NO:1的287位至317位氨基酸的ECD 4;和对应于SEQ ID NO:1的444位至449位氨基酸的ECD 6。

[0022] 在一些方面,VLP是MS2、Q β (Q- β)、PP7或AP205 VLP。可以对不同的xCT ECD进行密码子优化以在大肠杆菌(E.coli)中表达,并将它连接到RNA噬菌体单链二聚体外壳蛋白的氨基末端(N-末端)、羧基末端(C-末端)或AB环。

[0023] 在一些方面,VLP是基于土拨鼠嗜肝DNA病毒核心的VLP。将基于土拨鼠嗜肝DNA病毒核心的病毒样颗粒(WHcAg-VLP)用于展示xCT肽。WHcAg-VLP可以在三个不同展示点之一以环构象展示每个VLP的270个xCT肽拷贝。通常将本文所述的各种xCT肽的密码子优化序列插入土拨鼠嗜肝DNA病毒核心蛋白中。在一些方面,在大肠杆菌中制备VLP。

[0024] 以与剂量制剂相容的方式和以预防和/或治疗有效的量施用治疗组合物。所施用的量取决于待治疗的对象。需要施用的活性成分的精确量取决于医师的判断。可以以单剂量方案或优选以多剂量方案施用组合物。多剂量方案是这样一种方案,其中主要施用过程可以是使用1个至10个单独的剂量,随后在维持和/或加强治疗反应所需的后续时间间隔施用其他剂量,例如,在1个至4个月施用第二个剂量,如果需要,几个月后再施用后续剂量。

[0025] 施用可以例如经静脉内、经口、经鼻、经植入物、经黏膜、经皮、肌内、经直肠和皮下进行。以下采用许多常规使用的药物载体的递送系统仅代表了用于施用本发明的组合物的许多设想的实施方案。应用方式可能会有所不同。施用多肽疗法的任何常规方法都是适用的。认为这些包括通过注射等肠胃外途径。组合物的剂量取决于施用的途径,并会根据对象的尺寸和健康而改变。

[0026] 短语“治疗癌症”和“癌症治疗”是指减少、降低或抑制癌细胞的复制;减少、降低或抑制癌症的扩散(转移的形成);减小肿瘤大小;减少肿瘤数量(即减少肿瘤负担);减少或降低体内癌细胞的数量;防止在手术切除或其他抗癌疗法后癌症复发;或改善或减轻由癌症引起的疾病症状。

[0027] 当在权利要求或说明书中使用术语“抑制”、“减少”、“防止”包括为了实现预期结果的任何可测量的减少或完全的抑制。

[0028] 在本申请全文讨论本发明的其他实施方案。所讨论关于本发明的一方面的任何实施方案也适用于本发明的其他方面,反之亦然。本文描述的每个实施方案应理解为适用于本发明所有方面的本发明的实施方案。预期本文所讨论的任何实施方案可以针对本发明的任何方法或组合物实施。此外,本发明的组合物和试剂盒可以用于实现本发明的方法。

[0029] 当在权利要求和/或说明书中与术语“包含”一起使用时,要素前面不使用数量词可以表示“一个”,但是其也符合“一个或更多个”、“至少一个”和“一个或多于一个”的意思。

[0030] 在本申请全文,术语“约”用于表明数值包含了用于确定数值使用的装置或方法的标准差。

[0031] 术语“或”在权利要求中的使用用于表示“和/或”,除非明确地说明是仅指选择性的,或选择性是相互排斥的,尽管公开支持仅指选择性的和“和/或”的定义。

[0032] 如本说明书和权利要求所使用的,词语“包含”、“具有”、“包括”或“含有”是包括性的或开放式的,并且不排除另外的、未列举的元素或方法步骤。

[0033] 本发明的其他目的、特征和优点通过下面的详细描述会变得明显。然而,应该理解的是,详细描述和具体实施例虽然表明了本发明的具体实施方案,但仅以说明的方式给出,因为根据本详细描述在本发明的精神和范围内的各种变化和修改对于本领域技术人员将变得明显。

附图说明

[0034] 以下附图构成本说明书的一部分,并且包括在内以进一步说明本发明的一些方面。通过参照一个或多于一个这些附图结合本文所提供的说明书实施方案的详细说明可以更好地理解本发明。

[0035] 图1. AX09诱导的抗体影响BCSC生物学并抑制人细胞中的xCT功能。将第1代MDA-MB-231衍生的肿瘤球解离并与在球体培养基中50 μ g/ml的从对照VLP或AX09处理的小鼠中分离的纯化的IgG一起重新接种(4 $\times 10^5$ /孔)。将不包含IgG的培养基用作对照。五天后分析培养物,每个测定重复三次。误差棒表示标准差,**表示学生t检验的p值小于0.01。(A) 为了分析BCSC的自我更新,对在3D培养中形成的继发肿瘤球的数量进行计数,并绘制为球体数/10³个接种细胞。(B) 用获得的球体图像评估BCSC增殖,并使用ImageJ软件计算平均球体直径的测量值。(C) 通过测量细胞间ROS水平评估AX09免疫血清抑制xCT功能的能力。将解离的球与2,7-二氢二氯荧光素二乙酸盐一起孵育,并通过FACS评估ROS水平。(D) 为了确定BCSC在肿瘤球中的频率,将球解离成单细胞悬浮液,并通过将细胞与ALDEFLUOR一起孵育并通过FACS分析细胞来分析醛脱氢酶活性。绘制ALDH阳性细胞的百分比(指示为肿瘤干细胞/祖细胞)。

[0036] 图2将纯化的IgG与三阴性乳腺癌衍生干细胞一起孵育。从ECD6 VLP纯化的IgG和ECD3 VLP纯化的IgG两者和小鼠TUB0衍生的癌症干细胞。

[0037] 图3将纯化的IgG与三阴性乳腺癌衍生干细胞一起孵育。从ECD6 VLP纯化的IgG和ECD3 VLP纯化的IgG两者和小鼠4T1衍生的癌症干细胞。

[0038] 图4将纯化的IgG与三阴性乳腺癌衍生干细胞一起孵育。从ECD6 VLP纯化的IgG和ECD3 VLP纯化的IgG两者和人HTC1806衍生的癌症干细胞。

[0039] 图5将纯化的IgG与三阴性乳腺癌衍生干细胞一起孵育。从ECD6 VLP纯化的IgG和

ECD3 VLP纯化的IgG两者和人MB-MDA 231衍生的癌症干细胞。

[0040] 图6对疫苗接种方案的血清,用FACS分析与4T1细胞的xCT细胞外区域结合的诱导抗体,显示有纯化的IgG。

[0041] 图7将4T1衍生的肿瘤球与培养基、SASP (50 μ M)、或来自接种或未接种小鼠的血清的1:50稀释液一起孵育5天,以测量报告为肿瘤球数/ 10^3 接种细胞的球体生成能力。

[0042] 图8 ELISA中有五个克隆针对mECD3肽呈阳性,即:使用人xCT蛋白进行的ELISA分析中的11D1/C3;11D1/H7;11D1/E7;11D1/E5;11D1/H10。

[0043] 图9通过针对人xCT ECD3肽[1 μ g/mL]的ELISA对亚克隆:H10-C3-E7进行测试。

[0044] 图10根据该ELISA,选择H10 (此处称为11D1/H10) 作为产生抗xCT Ig的代表性亚克隆。为了区分11D1/H10的上清液中存在何种Ig同种型,使用了Pierce快速同种型试剂盒(#26178;Thermo Scientific)。

[0045] 图11数据表明11D1/H10不是克隆,但其包含产生不同Ig同种型的细胞。因此,对11D1/H10进行亚克隆,获得30个新克隆,然后通过ELISA进行测试。

[0046] 图12图至图17这些克隆中的五个产生了针对xCT的分泌Ig (ELISA O.D.450 $\geq$ 0.400)。测试这些亚克隆 (图12-A1、图13-A5、图14-B9、图15-D5、图16-E1) 的培养上清液中抗xCT Ig或Ig同种型的存在。

[0047] 发明描述

[0048] 一些癌细胞表达异常高水平的对胱氨酸/谷氨酸交换具有特异性的异二聚体氨基酸转运蛋白系统 x_c^- 的浆细胞膜组分。系统 x_c^- 将L-胱氨酸转运进入细胞的细胞室内,其需要L-胱氨酸来合成谷胱甘肽(L- γ -谷氨酰-L-半胱氨酸甘氨酸,在本文中称为“GSH”),这是对缺氧条件下例如存在于肿瘤环境中的细胞的细胞存活重要的抗氧化剂。系统 x_c^- 转运进入的结构由SLC7A11和SLC3A2组成,SLC7A11是赋予转运蛋白针对胱氨酸的特异性的催化亚基,SLC3A2是调节性亚基。SLC7A11和SLC3A2在本领域中也分别称为xCT和4F2hc/CD98。

[0049] 因为肿瘤细胞和其他异常快速分裂或分化的细胞需要更大量的GSH来处理更高水平的氧化应激,所以这些细胞比正常条件下的正常细胞表达更高的用于胱氨酸转运进入的系统 x_c^- 组分。这样,本发明通过提供靶向靶细胞 (例如,癌症干细胞(CSC)) 的xCT组分的抗xCT抗体,利用了过度增殖细胞增加的系统 x_c^- 组分的表达。

[0050] 治疗性抗体

[0051] 本发明的一些实施方案涉及识别人xCT或表达其的细胞的抗体,例如单克隆抗体。本发明还涉及产生抗体的杂交瘤细胞系,以及使用抗体治疗癌症的方法。抗体识别并特异性结合天然形式的人xCT,该xCT在细胞膜上表达。

[0052] 术语“抗体”在本文中以最广义使用,并且通常是指包含至少一个抗原结合位点的分子,该至少一个抗原结合位点免疫特异性地结合特定的目的抗原靶标。因此,术语“抗体”包括但不限于抗体及其变体、抗体及其变体的片段、肽体及其变体、和模仿抗体或其特定片段或部分的结构和/或功能的抗体模拟物,包括单链抗体及其片段。因此,术语“抗体”包括全长抗体或它们的变体以及其片段。抗体与靶标的结合可引起多种作用,例如但不限于,其在体外、原位和/或体内调节、降低、增加、拮抗、激动、减轻、减缓、阻断、抑制、消除或干扰至少一种靶向活性或结合、或受体活性或结合。

[0053] 因此,本发明包括能够结合xCT或其部分的抗体,包括但不限于Fab、Fab'和F

(ab')₂、fab_c、pFc'、Fd、Fv或scFv片段；双抗体；直链抗体；单链抗体分子；由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0054] 因此，抗体以最广泛的涵义使用，具体包括例如单抗xCT单克隆抗体（包括激动剂、拮抗剂和中和抗体）、具有多表位特异性的抗xCT抗体组合物、单链抗xCT抗体和抗xCT抗体的片段。

[0055] 如本文所使用的，术语“单克隆抗体”指从基本上均质的抗体群体中获得的抗体，即，除了可能存在少量的自然发生的突变之外，构成群体的单个抗体是相同的。在一些方面，描述了特异性结合xCT肽的单克隆抗体。

[0056] 本发明的特异性抗体片段包括但不限于：(i) 由VL、VH、CL和CH1结构域组成的Fab片段，(ii) 由VH和CH1结构域组成的Fd片段，(iii) 由单个抗体的VL和VH结构域组成的Fv片段；(iv) 由单个可变区域组成的dAb片段 (Ward等人, 1989, *Nature* 341:544-46)；(v) 分离的CDR区；(vi) F(ab')₂片段，其是包含两个连接的Fab片段的二价片段，(vii) 单链Fv分子(scFv)，其中VH域和VL域通过肽接头连接，该接头允许两个结构域结合形成抗原结合位点 (Bird等人, 1988, *Science* 242:423-26, Huston等人, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:5879-83)，(viii) 双特异性单链Fv (WO 03/11161) 和 (ix) “双抗体”或“三抗体”，其是通过基因融合构建的多价或多特异性片段 (Tomlinson等人, 2000, *Methods Enzymol.* 326:461-79; WO94/13804; Holliger等人, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:6444-48)。可以修饰抗体片段。例如，可以通过结合二硫键连接VH和VL结构域来稳定分子 (Reiter等人, 1996, *Nature Biotech.* 14:1239-1245)。

[0057] “Fv”是包含完整抗原识别和结合位点的最小抗体片段。该区域由紧密的非共价结合的一个重链和一个轻链可变结构域的二聚体组成。以此配置，每个可变结构域的三个CDR相互作用以在VH-VL二聚体的表面上限定抗原结合位点。六个CDR共同为抗体赋予抗原结合特异性。然而，甚至单个可变结构域（或仅包含三个对抗原具有特异性的CDR的一半的Fv）也具有识别和结合抗原的能力，尽管亲和力低于整个结合位点。

[0058] Fab片段还包含轻链的恒定结构域和重链的第一恒定结构域(CH1)。Fab片段与Fab'片段的区别在于，在重链CH1结构域的羧基末端添加了一些残基，包括来自抗体铰链区的一个或多于一个半胱氨酸。Fab'-SH是本发明中的Fab'中恒定结构域的半胱氨酸残基带有游离硫醇基的Fab'的名称。F(ab')₂抗体片段最初是成对的Fab'片段，它们之间具有铰链半胱氨酸。抗体片段的其他化学连接也是已知的。

[0059] 根据其恒定结构域的氨基酸序列，可以将来自任何脊椎动物的抗体（免疫球蛋白）的“轻链”分为两种明显不同的类型，称为κ和λ。

[0060] 根据其重链恒定结构域的氨基酸序列，免疫球蛋白可分为不同类别。免疫球蛋白有五种主要类别：IgA、IgD、IgE、IgG和IgM，其中的一些可以进一步分为亚类（同种型），例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA和IgA2。

[0061] “单链Fv”或“sFv”抗体片段包含抗体的VH和VL结构域，其中这些结构域存在于单个多肽链中。优选地，Fv多肽还包含在VH和VL结构域之间的多肽接头，其使sFv能够形成所需的抗原结合结构。有关sFv的综述，请参见Pluckthun的*The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*，第113卷，Rosenburg和Moore编辑，Springer-Verlag, New York，第269至315页（1994）。

[0062] 术语“双抗体”指具有两个抗原结合位点的小抗体片段,该片段包含与同一条多肽链(VH-VL)中的轻链可变结构域(VL)连接的重链可变结构域(VH)。通过使用因太短而不能使同一条链上的两个结构域之间配对的接头,这些结构域被迫与另一条链的互补结构域配对并产生两个抗原结合位点。在例如EP 404097;WO 93/11161;和Hollinger等人(1993) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444中对双抗体有更全面的描述。

[0063] “分离的”抗体是已经从其天然环境的组分中鉴定、分离和/或回收的抗体。其天然环境的污染物组分是会干扰抗体诊断或治疗用途的物质,并且可能包括酶、激素以及其他蛋白或非蛋白溶质。在优选的实施方案中,通过Lowry法测定,将抗体纯化至大于抗体的95重量%,最优选大于99重量%;达到足以通过使用旋转杯测序仪获得至少15个N-末端或内部氨基酸序列残基的程度;或在还原或非还原条件下使用考马斯亮蓝或优选银染通过SDS-PAGE达到均一性。分离的抗体包含重组细胞内的原位抗体,因为抗体的天然环境中至少有一种成分不存在。然而,通常分离的抗体将通过至少一个纯化步骤来制备。

[0064] “天然序列xCT多肽”包含具有与来源于天然的相应xCT多肽具有相同的氨基酸序列的多肽,例如SEQ ID NO:1。这样的天然序列xCT多肽可以从自然界中分离或可以通过重组或合成方式制备。术语“天然序列xCT多肽”具体包含特异性xCT多肽的天然存在的截短或分泌形式(例如,环或部分环序列)、天然存在的变体形式(例如,可变剪接形式)和天然存在的多肽的等位基因变体。

[0065] 本文可互换使用的术语“个体”、“对象”和“患者”指动物,优选哺乳动物(包括非灵长类动物和灵长类动物),包括但不限于鼠类、猿类、人类、哺乳类农场动物(例如牛、猪、绵羊)、哺乳类运动动物(例如马)和哺乳类宠物(例如犬科动物和猫科动物);优选地,该术语指人类。

[0066] 如本文所使用的,术语“治疗”指获得所需的药理或生理效果。就疾病、症状和/或可归因于疾病的副作用的部分或完全治愈而言,该效果可以是治疗性的。本文所使用的“治疗”包括施用本发明的化合物以治疗哺乳动物,特别是人类的疾病或病症,并且包括:(a)抑制疾病,即阻止其发展;(b)提供缓和治疗,即减少和预防患者的痛苦;(c)缓解疾病,即引起疾病或病症的消退或减轻其症状或并发症。可以调整剂量方案以提供最佳的期望反应。

[0067] “框架”或“FR”残基是除本文定义的超可变区(HVR)残基以外的那些可变结构域残基。“人共有框架”或“受体人框架”是代表在人免疫球蛋白VL或VH框架序列的选择中最常见的氨基酸残基的框架。通常,人免疫球蛋白VL或VH序列的选择来自可变结构域序列的亚组。通常,序列的亚组是如Kabat等人的Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1991)中的亚组。实例包括VL的亚组可以是如上文Kabat等人所述的 κ I、 κ II、 κ III或 κ IV。另外,VH的亚组可以是如上文Kabat等人所述的亚组I、亚组II或亚组III。或者,人共有框架可以从上面衍生,其中特定的残基,例如当通过将供体框架序列与各种人框架序列的集合进行比对且基于与供体框架的同源性来选择人框架残基时。“衍生自”人免疫球蛋白框架或人共有框架的受体人框架可以包含与其相同的氨基酸序列、或者它可以包含预先存在的氨基酸序列变化。在一些实施方案中,预先存在的氨基酸变化的数目是10或小于10、9或小于9、8或小于8、7或小于7、6或小于6、5或小于5、4或小于4、3或小于3、或2或小于2。

[0068] 如本文所使用的,术语“特异性结合”或“特异于”指可测量和可再现的相互作用,

例如靶标与抗体之间的结合,这决定了在存在包括生物分子的异质群体的情况下靶标的存在。例如,特异性结合靶标(可以是表位)的抗体是以比它结合其他靶标时具有更大的亲和力和亲合力、更容易和/或更长的持续时间结合该靶标的抗体。在一个实施方案中,抗体与无关靶标的结合程度小于例如通过放射免疫测定法(RIA)所测量的抗体与靶标的结合程度的约10%。在一些实施方案中,特异性结合靶标的抗体的解离常数(K_D)为 $<1 \times 10^{-6}M$ 、 $<1 \times 10^{-7}M$ 、 $<1 \times 10^{-8}M$ 、 $<1 \times 10^{-9}M$ 或 $<1 \times 10^{-10}M$ 。

[0069] “抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”或ADCC指细胞毒性的一种形式,其中分泌的Ig结合到一些细胞毒性细胞(例如自然杀伤(NK)细胞、嗜中性粒细胞和巨噬细胞)上存在的Fc受体(FcR)上,使这些细胞毒性效应细胞特异性结合到携带抗原的靶细胞上,随后用细胞毒素杀死靶细胞。抗体“武装”细胞毒性细胞,并且是通过这种机制杀死靶细胞所需的。介导ADCC的初级细胞NK细胞仅表达Fc γ RIII,而单核细胞表达Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIII。Ravetch和Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991) 的第464页表3总结了造血细胞上的Fc表达。除非本文另有说明,否则免疫球蛋白重链中的残基编号是如上文Kabat等人所述的EU索引的编号。“如Kabat中的EU索引”指人IgG1 EU抗体的残基编号。

[0070] “结合亲和力”通常指(例如,抗体的)分子的单个结合位点与其结合伴侣(例如,抗原)之间的非共价相互作用的总和的强度。除非另有说明,否则如本文所使用的,“结合亲和力”或“结合至”指反映结合对成员(例如抗体Fab片段和抗原)之间1:1相互作用的内在结合亲和力。分子X对其伴侣Y的亲和力通常可由解离常数(K_D)表示。亲和力可以通过本领域已知的常规方法来测量,包括本文所述的那些。低亲和力抗体通常缓慢地结合抗原并且易于解离,而高亲和力抗体通常更快地结合抗原并且倾向于保持更长时间的结合。测量结合亲和力的各种方法是本领域已知的,其中任何方法都可用于本发明的目的。用于测量结合亲和力的特定说明性和示例性实施方案。

[0071] 在一个实施方案中,根据本发明的“ K_D ”或“ K_D 值”通过用抗体和抗原分子的Fab形式进行的放射性标记的抗原结合测定(RIA)来测量,如以下测定所述,该测定通过在滴定一系列未标记的抗原的情况下用最小浓度的(^{125}I)标记的抗原平衡Fab,然后用抗Fab抗体涂覆的板捕获结合的抗原来测量Fab对抗体的溶液结合亲和力(Chen等人, (1999) *J. Mol. Biol.* 293:865-881)。为了建立测定条件,将微量滴定板(Dynex)用在50mM碳酸钠(pH 9.6)中的5 μ g/ml捕获抗Fab抗体(Cappel Labs)涂覆过夜,然后在室温下(约23 $^{\circ}C$)用2重量/体积%的牛血清白蛋白的PBS溶液进行两个至五个小时的封闭。在非吸附板(Nunc#269620)中,将100pM或26pM [^{125}I] 抗原与目标Fab的系列稀释液混合。然后将目标Fab孵育过夜。但是,孵育可能会持续更长的时间(例如65小时),以确保达到平衡。之后,将混合物转移至捕获板上,在室温下孵育一小时。然后除去溶液,并用0.1%吐温-20的PBS溶液将板洗涤八次。当板干燥后,添加150 μ l/孔的闪烁剂(Micro Scint-20;Packard),并将板在Topcount γ 计数器(Packard)上计数十分钟。选择产生小于或等于最大结合的20%的每个Fab的浓度用于竞争性结合测定。

[0072] 如本文所使用的,术语“构象表位”指当多肽链折叠形成天然蛋白时在表面上聚集在一起的抗原的氨基酸残基。

[0073] A. 单克隆抗体

[0074] 抗xCT抗体可以是单克隆抗体。可以使用杂交瘤方法来制备单克隆抗体,例如

Kohler和Milstein(1975) Nature 256:495中所描述的那些。在杂交瘤方法中,通常用免疫剂免疫小鼠、仓鼠或其他合适的宿主动物,以引发产生或能够产生与免疫剂特异性结合的抗体的淋巴细胞。或者,可以在体外免疫淋巴细胞。

[0075] 免疫剂通常包括xCT多肽、肽或其融合蛋白。通常,如果需要人类来源的细胞,则使用外周血淋巴细胞(“PBL”),或者如果需要非人类哺乳动物来源的细胞,则使用脾细胞或淋巴结细胞。然后使用合适的融合剂例如聚乙二醇将淋巴细胞与永生化细胞系融合,以形成杂交瘤细胞(Goding(1986) Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 学术出版社,第59至103页)。永生化细胞系可以是转化的哺乳动物细胞,特别是啮齿动物、牛和人来源的骨髓瘤细胞。可以使用大鼠或小鼠骨髓瘤细胞系。杂交瘤细胞可以在合适的培养基中培养,该培养基优选包含一种或多于一种抑制未融合的永生化细胞的生长或存活物质。例如,如果亲代细胞缺乏次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT或HPRT),则杂交瘤的培养基通常将包含次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸苷(“HAT培养基”),这些物质会阻止HGPRT缺陷细胞的生长。

[0076] 优选的永生化细胞系是那些能通过所选抗体生成细胞而有效融合、支持抗体的稳定高水平表达,并对培养基例如HAT培养基敏感的那些。更优选的永生化细胞系是小鼠骨髓瘤系,其可以例如从加利福尼亚州圣地亚哥的索尔克研究所细胞分布中心和弗吉尼亚州马纳萨斯的美国典型培养物保藏中心获得。人骨髓瘤和小鼠-人异源骨髓瘤细胞也已经被描述用于制备人单克隆抗体(Kozbor, J. (1984) Immunol. 133:3001; Brodeur等人(1987) Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, 第51至631页)。

[0077] 然后可以测定培养了杂交瘤细胞的培养基中是否存在针对本文所述的xCT或xCT肽的单克隆抗体。杂交瘤细胞产生的单克隆抗体的结合特异性可以通过免疫沉淀或通过体外结合测定法来确定,例如放射免疫测定法(RIA)或酶联免疫吸附测定法(ELISA)。这样的技术和测定是本领域已知的。单克隆抗体的结合亲和力可以例如通过Munson和Pollard(1980) Anal. Biochem. 107:220的Scatchard分析来确定。

[0078] 可以通过常规的免疫球蛋白纯化方法,例如蛋白A-琼脂糖、羟磷灰石层析、凝胶电泳、透析或亲和层析,从培养基或腹水中分离或纯化由亚克隆分泌的单克隆抗体。

[0079] 单克隆抗体也可以通过重组DNA方法制备,例如在美国专利4816567中描述的那些。编码本发明单克隆抗体的DNA可以使用常规方法容易地分离和测序,例如通过使用能够与编码鼠抗体重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针。本发明的杂交瘤细胞用作这种DNA的优选来源。分离后,可将DNA置于表达载体中,然后将其转染至宿主细胞例如猿类COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或不产生免疫球蛋白的骨髓瘤细胞中,以获得重组宿主细胞中单克隆抗体的合成。还可以例如通过用人重链和轻链恒定结构域的编码序列代替同源鼠序列(US 4816567; Morrison等人,同上)或通过全部或部分编码非免疫球蛋白多肽的序列共价结合至免疫球蛋白的编码序列来修饰DNA。这样的非免疫球蛋白多肽可以代替本发明的抗体的恒定结构域,或者可以代替本发明的抗体的一个抗原结合位点的可变结构域,以产生具有不同抗原结合特异性的嵌合双功能或多功能抗体,每个抗体可以是单价、二价或多价的。

[0080] 本发明的抗体可以是单价抗体。制备单价抗体的方法是本领域众所周知的。例如,

一种方法涉及免疫球蛋白轻链和修饰的重链的重组表达。重链通常在Fc区域的任何点被截短以防止重链交联。或者,相关的半胱氨酸残基由另一个氨基酸残基取代或缺失以防止交联。

[0081] 本发明的抗xCT单克隆抗体可以是与xCT多肽或肽结合的抗体的完整片段或抗原结合片段,优选天然序列xCT多肽。此外,在一个优选的实施方案中,将单克隆抗体鉴定为具有对来自至少一种癌细胞系的xCT蛋白的识别。

[0082] 在一个非限制性实施方案中,单克隆抗体由杂交瘤细胞系制备,其中所述抗体或其功能片段结合XCT蛋白,并且其中所述抗体或其功能片段结合CSC、赘生性细胞或其抗原作为所述抗体或其功能片段。

[0083] B. 人和人源化抗体

[0084] 本发明的单克隆抗体可以是人的或人源化的,以降低用于人的免疫原性。非人(例如鼠)抗体的人源化形式是嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段(例如Fv,Fab,Fab',F(ab')₂或抗体的其他抗原结合亚序列),其包含衍生自非人免疫球蛋白的最小序列。人源化抗体包含人免疫球蛋白(受体抗体),其中受体的互补决定区(CDR)的残基被例如小鼠、大鼠或兔的非人物种(供体抗体)的CDR残基取代,其具有所需的特异性、亲和力和能力。在一些情况下,人免疫球蛋白的Fv框架残基被相应的非人残基替代。人源化抗体还可包含在受体抗体或转运进入的CDR或框架序列中均未发现的残基。通常,人源化抗体将包含至少一个通常是两个可变结构域的基本上全部,其中全部或基本上全部的CDR区域对应于非人免疫球蛋白的那些,并且全部或基本上全部的FR区域是人免疫球蛋白共有序列的那些。最佳地,人源化抗体还将包含至少一部分免疫球蛋白恒定区(Fc),通常是人免疫球蛋白的恒定区(Jones等人(1986) *Nature* 321:522;Riechmann等人(1988) *Nature* 332:323;和,Presta(1992) *Curr.Op.Struct.Biol.* 2:593)。

[0085] 使非人抗体人源化的方法是本领域众所周知的。一种示例性方法是制备具有连接到人免疫球蛋白的恒定区的小鼠单克隆抗体的原始可变区的小鼠-人嵌合抗体。嵌合抗体及其制备方法是本领域已知的。参见,例如,Cabilly等人,欧洲专利EP0125023(2002年3月3日公开);Taniguchi等人,欧洲专利EP0171496(1993年5月26日公开);和Morrison等人,欧洲专利申请EP0173494(1986年1月18日公开);和Neuberger等,国际公开第W0/1986/01533号,(1986年3月13日公开);Kudo等人,欧洲专利申请EP0184187(1986年6月11日公开);和Robinson等人,国际公开第W0/1987/002671号(1987年5月7日公开);和Liu等人(1987) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 84:3439;Sun等人(1987) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 84:214;Better等人(1988) *Science* 240:1041。这些参考文献通过引用并入本文。通常,可以从产生mAb的杂交瘤细胞克隆编码鼠mAb的H链和L链抗原结合区的DNA片段,然后将其分别与编码人免疫球蛋白C_H和C_L区域的DNA片段连接以产生鼠-人嵌合免疫球蛋白编码基因。

[0086] 嵌合抗体还可以通过用来自人Fv可变区的等同序列替换不直接参与抗原结合的Fv可变区的序列来人源化。产生人源化抗体的一般方法由Morrison,S.L.,1985, *Science* 229:1202-1207、由Oi等人,1986, *BioTechniques* 4:214,和由Queen等人美国专利第5585089号、美国专利第5693761号和美国专利第5693762号提供,其全部内容通过引用并入本文。这些方法包括从重链或轻链的至少一个中分离、操纵和表达编码免疫球蛋白Fv可变区的全部或部分的核酸序列。此类核酸的来源是本领域技术人员众所周知的,并且例如可

以从产生抗GPIIb/IIIa抗体的杂交瘤7E3获得。然后可以将编码嵌合抗体的重组DNA克隆到合适的表达载体中。

[0087] 通常,人源化抗体具有从非人来源引入的一个或多于一个氨基酸残基。这些非人氨基酸残基通常被称为“转运进入”残基,其通常取自“转运进入”可变结构域。人源化基本上可以按照Winter和同事的方法进行(Jones等人(1986) *Nature* 321:522;Riechmann等人(1988) *Nature* 332:323;Verhoeyen等人(1988) *Science* 239:1534),通过用啮齿动物CDR或CDR序列取代人抗体的相应序列。另请参见美国专利第5225539号和Beidler等人1988 *J. Immunol.* 141:4053。因此,此类“人源化”抗体是嵌合抗体(美国专利第4816567号),其中基本上少于完整的人可变结构域已被来自非人物种的相应序列取代。在实践中,人源化抗体通常是人抗体,其中一些CDR残基和可能的一些FR残基被啮齿动物抗体中类似位点的残基取代。

[0088] 人抗体也可以使用本领域已知的各种技术制备,包括噬菌体展示文库(Hoogenboom和Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks等人 *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991))。Cole等人(1991)和Boerner等人的技术也可用于制备人单克隆抗体(Cole等人, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, 第77页(1985)和Boerner等人 *J. Immunol.*, 147(1):86 (1991))。类似地,可以通过将人免疫球蛋白基因座引入转基因动物中例如小鼠中内源性免疫球蛋白基因已被部分或完全失活的小鼠中来制备人抗体。引入后,观察到人抗体产生,这在包括基因重排、组装和抗体库在内的所有方面都与人的抗体非常相似。该方法例如在美国专利5545807;5545806;5569825;5625126;5633425;5661016中以及以下科学出版物中有描述: Marks等人 *Bio/Technology* 10:779 (1992); Lonberg等人 *Nature* 368:856 (1994); Morrison, *Nature* 368:812 (1994); Fishwild等人 *Nature Biotechnology* 14:845 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14:826 (1996); Lonberg和Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65 (1995)。

[0089] C. 抗体的药物组合物

[0090] 在其他实施方案中,提供了药物组合物,其包含如上所述的抗体以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

[0091] 如对于本领域技术人员是明显的,在制备包含本文教导中描述的抗体的药物组合物时,可以使用多种载体和赋形剂以及给药途径。代表性的配方技术尤其由Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 第19版, Mack Publishing Co., Easton, Pa. (1995)和 *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 第三版, Kibbe, A.H. 编辑, Washington D.C., American Pharmaceutical Association (2000) 教导;其通过引用整体并入。

[0092] 药物组合物通常将包含药学上可接受的载体和药理有效量的抗体或抗体混合物。

[0093] 如本文所使用的,“药学上可接受的载体”包括在配制药物组合物中本领域普通技术人员已知的任何标准药学上可接受的载体。因此,抗体或肽本身,例如以药学上可接受的盐或缀合物形式存在的抗体或肽本身可以在药学上可接受的稀释剂例如盐水、磷酸盐缓冲盐水(PBS)、乙醇水溶液或葡萄糖、甘露醇、右旋糖酐、丙二醇、油类(例如植物油、动物油、合成油等)、微晶纤维素、羧甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、硬脂酸镁、磷酸钙、明胶、聚山梨酯80的溶液中制备为制剂、或在适当的赋形剂中制备为固体制剂。

[0094] 药物组合物还可以包含一种或多于一种缓冲剂(例如中性缓冲盐水或磷酸盐缓冲

盐水)、碳水化合物(例如葡萄糖、蔗糖或右旋糖酐)、甘露醇、蛋白、多肽或氨基酸例如甘氨酸、抗氧化剂(例如抗坏血酸、偏亚硫酸氢钠、丁基羟基甲苯、丁基羟基茴香醚等)、抑菌剂、螯合剂(例如EDTA或谷胱甘肽)、佐剂(例如氢氧化铝)、使制剂与受体血液等渗、低渗或弱高渗的溶质、悬浮剂、增稠剂和/或防腐剂。或者,可以将本发明的组合物配制成冻干物。

[0095] 尽管本领域普通技术人员已知的任何合适的载体都可以用于本发明的组合物中,但是载体的类型通常根据给药方式而变化。

[0096] 对于肠胃外给药,组合物可以作为物质在生理上可接受的稀释剂中的溶液或悬浮液的注射剂量而给药,该稀释剂具有药物载体,该药物载体可以是无菌液体,例如无菌无热原的水、油、盐水、甘油、聚乙二醇或乙醇。另外,组合物中可以存在辅助物质,例如润湿剂或乳化剂、表面活性剂、pH缓冲物质等。

[0097] 药物组合物的其他组分是石油、动物、植物或合成来源的组分,例如,花生油、大豆油、玉米油、棉籽油、油酸乙酯和肉豆蔻酸异丙酯的非水溶液。抗体可以以贮库注射剂或植入物制剂的形式给药,可以以允许活性组分持续释放的方式配制。示例性组合物可包含5mg/ml的抗体,该抗体配制在由50mM L-组氨酸、150mM NaCl组成的含水缓冲液中,并用HCl调节至pH6.0。

[0098] 通常,将组合物制备为可注射的形式,可以是液体溶液或悬浮液,也可以是固体或粉末形式,其适合用合适的载体进行重构,包括但不限于无菌无热原的水、盐水、缓冲溶液、右旋糖溶液等,然后再注射。制剂也可以被乳化或包封在脂质体或微粒例如聚丙交酯、聚乙交酯或共聚物中,或其他已知的包封技术。

[0099] 本文描述的药物组合物可以存在于单位剂量或多剂量容器中,例如密封的安瓿或小瓶中。这样的容器通常以在使用前保持制剂的无菌性和稳定性的方式密封。通常,如上所述,制剂可以以悬浮剂、溶液或乳剂的形式储存在油性或含水载体中。或者,药物组合物可以在冻干的条件下储存,仅需要在使用前立即加入无菌液体载剂。

[0100] D. 抗xCT抗体的用途

[0101] 本发明的抗xCT抗体具有多种用途。在一个实施方案中,提供了一种抗xCT在疾病例如癌症的治疗方法中的用途。如上所述,本发明的方法优选地包括向需要所述治疗的对象提供抗体或其xCT抗原结合片段的步骤。

[0102] 使用抗体或抗体片段免疫靶向癌细胞的方法是本领域众所周知的。例如,美国专利6306393描述了抗CD22抗体在B细胞恶性肿瘤的免疫疗法中的用途,美国专利6329503描述了表达蛇型跨膜抗原的细胞的免疫靶向。可以将本文所述的抗体(包括人源化或人单克隆抗体或其片段或其他修饰,任选地与细胞毒性或其他试剂缀合)引入患者中,使得抗体结合癌细胞并介导细胞和肿瘤的破坏和/或抑制细胞或肿瘤的生长。

[0103] 在不旨在限制本公开的情况下,此类抗体可发挥治疗作用的机制可包括例如补体介导的细胞溶解、抗体依赖性细胞毒性(ADCC)调节肿瘤抗原的生理功能、抑制结合或信号转导途径、调节肿瘤细胞分化、改变肿瘤血管生成因子谱、调节免疫刺激或肿瘤抑制细胞因子和生长因子的分泌、调节细胞黏附和/或通过诱导细胞凋亡。

[0104] 抗体也可以与毒性剂、化学治疗剂或治疗剂例如放射性配体或胞质毒素缀合,也可以用于将毒性剂或治疗剂直接递送至肿瘤细胞。

[0105] 治疗意在包括针对疾病、病症或不良状况的治疗、预防、缓和或抑制性治疗。治疗

包括在疾病症状发作之前和/或在疾病的临床表现或其他表现之后以适当的形式向对象施用抗体,以降低疾病的严重性、阻止疾病的进展或消除疾病。疾病的预防包括优选在对疾病的易感性增加的对象中延长或延迟病症或疾病的症状的发作。

[0106] 在一些方面,根据抗体的功能,治疗制剂可以使用未修饰的抗体或与治疗化合物例如毒素或细胞毒性分子缀合的抗体。通常,当使用未修饰的抗体时,它们通常将具有功能性Fc区。本文中的“功能性Fc区”指用于影响Fc的生物学功能,例如与Fc受体,特别是Fc γ R(例如Fc γ R、Fc γ RII和Fc γ RIII)结合的最小序列。

[0107] 不受理论的束缚,认为Fc区可通过与Fc受体免疫效应细胞结合并调节细胞介导的细胞毒性、内吞作用、吞噬作用、炎性细胞因子的释放、补体介导的细胞毒性和抗原递来影响抗肿瘤单克隆抗体的有效性。在这方面,多克隆抗体或单克隆抗体的混合物将是有利的,因为与使用单个单克隆抗体相比,它们将结合不同的表位,因此在细胞表面具有更高的Fc密度。当然,为了增强其在消耗靶细胞中的效力,或者在未修饰的抗体对治疗无效的情况下,可以使用与毒素或细胞毒性剂缀合的抗体。

[0108] 抗体组合物可单独使用或与其他治疗剂组合使用,以提高常规治疗的功效或靶向未被抗体靶向的异常细胞。本发明的抗体和抗体组合物可以包含例如PEG化的抗体和/或抗体的预靶向构建体。在未接受化学疗法治​​疗的患者中,将抗体治疗方法与化学疗法、放射疗法或外科手术方案相结合可能是优选的,而对于已接受一种或多种化学疗法的患者,可能需要使用抗体疗法进行治疗。另外,抗体疗法还能够使用减少剂量的伴随化学疗法,特别是在不能很好地耐受化学治疗剂毒性的患者中。此外,用抗体治疗具有对化疗药物有耐药性的肿瘤的癌症患者可能会诱导对这些药物组合的敏感性和反应性。

[0109] 在一个方面,抗体与治疗性细胞毒性剂辅助使用,该细胞毒性剂包括但不限于例如白消安、硫鸟嘌呤、伊达比星、胞嘧啶阿拉伯糖苷、6-巯基嘌呤、阿霉素、柔红霉素、依托泊苷和羟基脲。可用作抗体治疗的辅助剂的其他试剂是专门针对在疾病状态下发现的异常细胞分子的化合物。这些药物是疾病特异性的。

[0110] 为了达到特定的目的,将根据常规方法凭经验确定达到治疗效果所需的组合物的量。通常,出于治疗目的离体或体内施用组合物,组合物以药学上有效的剂量施用。“药学上有效量”或“药学上有效的剂量”是足以产生所需的生理作用的量或能够达到所需结果的量,特别是用于治疗或再治疗疾病或病症,包括减少或消除病症或疾病的一种或多种症状或表现。

[0111] 举例来说,对癌症患者施用抗体不仅在根除或改善潜在疾病方面,而且在患者报告与疾病相关的症状的严重性或持续时间降低方面,都提供了治疗益处。治疗益处还包括中止或减慢潜在疾病或病症的进展,无论是否实现了改善。

[0112] 施用于对象的量将根据所施用的物质、给药目的例如预防或治疗、对象的状态或状况、给药方式、给药次数、给药间隔等而变化。这些可以由本领域技术人员凭经验确定,并且可以针对治疗反应的程度进行调整。确定合适剂量时应考虑的因素包括但不限于对象的体型和体重、对象的年龄和性别、症状的严重程度、疾病的阶段、递送方法、抗体半衰期以及抗体的功效。要考虑的疾病阶段包括该疾病是急性或慢性、复发或缓解期以及疾病的进展。确定治疗有效量的剂量和给药时间在本领域普通技术人员的能力范围内。

[0113] 对于本公开的任何组合物,治疗有效剂量可以通过本领域众所周知的方法容易地

确定。例如,可以从细胞培养或其他体外测定中估计初始有效剂量。例如,Sliwowsky、MX等人(1999) Semin.Oncol.26.suppl.12:60描述了抗体依赖性细胞毒性的体外测量。然后可以在动物模型中配制剂量以产生循环浓度或组织浓度,包括通过细胞培养测定法确定的IC50浓度。

[0114] 此外,毒性和治疗功效通常通过细胞培养测定法和/或实验动物来确定,通常是通过确定LD50 (50%测试群体的致死剂量) 和ED50 (50%测试群体的治疗效力) 来确定。毒性和治疗效果的剂量比是治疗指数。优选的是表现出高治疗指数的单独或组合的组合物。有效量的确定完全在本领域技术人员的能力范围内,特别是考虑到本文提供的详细公开内容。在标准参考书中也可以找到指导,例如Fingl和Woodbury, General Principles In: The Pharmaceutical Basis of Therapeutics第1至46页(1975) 和其中引用的参考文献。

[0115] 为了获得初始耐受剂量,考虑了抗体在人和非人灵长类动物中可能具有免疫原性的可能性。即使抗体部分地或主要地由人免疫球蛋白序列组成,例如在嵌合或人源化抗体的情况下,免疫应答也可能具有生物学意义,并可能损害抗体的治疗效果。在一些实施方案中,施用初始高剂量的抗体,以便建立对治疗性抗体的免疫耐受程度。耐受剂量足以防止或减少对重复施用确定的祖细胞特异性抗体的抗体应答的诱导。

[0116] 耐受剂量的范围例如10mg/kg体重至50mg/kg体重。在一些实施方案中,耐受剂量的范围为20mg/kg和40mg/kg,包括端点。在其他实施方案中,耐受剂量的范围为20mg/kg至25mg/kg,包括端点。

[0117] 在这些治疗方案中,施用的抗体的治疗有效剂量可以为0.1mg/kg体重至10mg/kg体重,包括端点。在一些实施方案中,治疗有效剂量为0.2g/kg体重至5mg/kg体重,包括端点。在其他实施方案中,治疗有效剂量为0.5g/kg至2mg/kg,包括端点。在替代实施方案中,随后的一个或多个治疗剂量可以是与耐受剂量相同或不同的制剂,和/或可以通过与耐受剂量相同或不同的途径给药。

[0118] 可以将抗体组合物配制成用于任何合适的给药方式,包括例如经口、经鼻、经黏膜、静脉内、腹膜内、皮内、皮下和肌内给药。

[0119] 为了本发明的目的,根据所治疗的病症、主题抗体的形式和药物组合物选择给药方法。

[0120] 抗体组合物的施用可以以多种方式进行,包括但不限于连续、皮下、静脉内、经口、局部、透皮、腹膜内、肌内和膀胱内。例如,微粒、微球和微胶囊制剂可用于经口、肌内或皮下给药。脂质体和纳米颗粒还适合于静脉内给药。药物组合物的给药可以通过单一途径或同时通过几种途径进行。例如,腹膜内给药可以伴随静脉内注射。优选地,静脉内、腹膜内、肌内或皮下施用治疗剂量。

[0121] 组合物可以施用一次或几次。在一些实施方案中,组合物可以每天施用一次、每天施用几次或数次、或甚至每天施用多次,这取决于所治疗的适应症和处方医师的判断等。

[0122] 组合物的给药也可以通过本领域技术人员众所周知的持续释放或长期递送方法来实现。如本文所用,“持续释放”或“长期释放”是指递送系统施用药物治疗量的主题化合物超过一天,优选超过一周,最优选至少约30天至60天或多于60天的时间。长期释放系统可包括含有抗体的可植入固体或凝胶,例如上述的可生物降解的聚合物;泵,包括蠕动泵和碳氟化合物推进剂泵;渗透泵和微型渗透泵;等等。

[0123] 本发明的方法考虑施用单一单克隆抗体和任何识别由这些抗体识别的特定抗原的抗体、以及不同单克隆抗体的组合。与单一抗体相比,两种或多于两种单克隆抗体可以提供更好的效果。备选地,与单一抗体相比,抗体与结合不同抗原的抗体的组合可以提供改善的效果。这样的单克隆抗体混合物可具有一些优点,因为它们含有利用不同效应物机制、或将细胞毒性单克隆抗体与依赖免疫效应功能的单克隆抗体直接结合的单克隆抗体。此类单克隆抗体的组合可表现出协同治疗作用。

[0124] 在另一个实施方案中,抗xCT抗体可用于xCT的诊断测定中,例如检测其在特定细胞、组织或血清中的表达。

[0125] “检测”是指确定样品中分析物的存在、不存在或量,并且可以包括量化样品中或样品中每个细胞的分析物的量。

[0126] “诊断”是指识别病理状况的存在或性质。诊断方法的特异性和敏感性不同。尽管特定的诊断方法可能无法提供对病症的明确诊断,但如果该方法提供有助于诊断的积极指示就足够了。

[0127] 本发明涉及用于检测细胞、组织和体液中xCT多肽水平的定量和定性的诊断测定,包括正常和异常水平的确定。可用于确定衍生自宿主的样品中的多肽水平例如本发明的xCT水平的测定技术是本领域技术人员众所周知的。这样的测定方法包括但不限于放射免疫测定、免疫组织化学测定、原位杂交测定、竞争结合测定、蛋白印迹分析和ELISA测定。其中,ELISA通常用于检测生物体液中基因表达的蛋白。ELISA测定法最初包括制备对xCT具有特异性的抗体,优选单克隆抗体。另外,通常制备与xCT特异性结合的报告抗体。报告抗体连接于可检测试剂,例如放射性、荧光、或酶试剂例如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶。

[0128] 可以对衍生自对象的体液和组织提取物(匀浆或溶解的组织)例如来自组织活检和尸检材料的样品进行上述测试。将通过测量多肽或通过转录水平在怀疑患有癌症的患者的细胞和组织中确定的xCT水平与正常或对照细胞或组织中的xCT水平进行比较。与从正常健康个体获得的相同细胞、组织或体液中的水平相比,在对象中测得的xCT水平升高表明癌症。“水平升高”是指与相同正常细胞或组织中的xCT水平相比,对象中测量的xCT水平增加。xCT水平升高的检测可用于诊断各种癌症,包括但不限于乳腺癌、胰腺癌、前列腺癌、黑色素瘤、结肠癌、肺癌和甲状腺癌。

[0129] 此外,在诊断出患有癌症的对象中监测xCT水平可用于确定尚未转移的癌症中转移的开始以及确定癌症的阶段。例如,xCT的检测可以用于在尚未转移的对象中监测癌症转移开始的方法。在这种方法中,鉴定出患有未知转移的癌症的对象。然后测量来自对象的样品中的xCT水平。然后将这些测得的xCT水平与正常对照样品的xCT水平进行比较。与正常对照相比,对象体内xCT水平升高与已转移的癌症有关。

[0130] 还可以确定对象患有的癌症的阶段。在这种方法中,鉴定患有癌症的对象。测量来自患者的组织样品中的xCT水平以建立所述患者的基线xCT水平。然后,在随后的时间段例如与对象的医生进行计划的检查中确定同一组织的样品中的xCT水平。然后将测量的xCT水平与患者的基线xCT水平进行比较。在该方法中,对象中测量的xCT水平相对于对象中的基线xCT水平的增加与进行中的癌症相关,而测量xCT水平相对于基线xCT水平的降低与正在消退或缓解的癌症相关。与为对象建立的基线xCT水平相比,测量的xCT水平增加也可能指示转移。

[0131] 在一个实施方案中，xCT免疫组织化学起“指数诊断”的作用以基于xCT表达的存在来为风险赋值。因此，基于该参数和其他参数（例如，病变的大小），本领域技术人员可以确定是否应当使用不同的治疗方式（即化学疗法、放射疗法、手术）。在相关方面，公开了用于监测癌前发展为恶性表型的方法。例如，通过使用组织的连续采样（即活体标本检查）并观察病变中xCT表达的状态，本领域技术人员可以确定恶性肿瘤是否以指示治疗性干预是否被建议或是否成功的方式进展。

[0132] 本发明的一个方面是一种确定一组细胞癌变的可能性的方法，例如，细胞或腺体变为癌前病变或发展为癌性病变。本发明利用与xCT蛋白特异性结合的试剂例如抗体以评估组织和细胞中xCT的水平。还可以使用核酸分析例如选择性扩增或杂交方法来评估细胞和组织中的xCT表达。xCT的水平高于正常水平或对照水平，表明存在癌前疾病，即细胞或组织是癌前的可能性增加。

[0133] E. 抗体试剂盒

[0134] 提供了一种包含进行本发明的治疗或测定所需的试剂的抗体试剂盒。试剂盒可能包括一个或多于一个隔室，每个隔室可容纳一个或多于一个容器，例如：(a) 第一容器，其包括上述本发明的组分之一；和(b) 一个或多于一个其他容器，其包含以下一种或多种：洗涤试剂、能够检测抗体或肽的存在的试剂。

[0135] 容器允许试剂从一个隔室有效转移到另一隔室，从而不会交叉污染样品和试剂，并且每个容器的试剂或溶液可以以定量方式从一个隔室添加到另一个隔室。

[0136] 该试剂盒通常包含可由多种材料制成的容器，例如玻璃或塑料，并且可包括例如瓶、小瓶、注射器和试管。标签通常随附于试剂盒，并且包括任何书面或记录的材料，其可以是电子或计算机可读形式（例如磁盘、光盘或磁带），以提供有关试剂盒内容物使用的说明或其他信息。标签表明制剂用于诊断或治疗选择的疾病。

[0137] 本领域技术人员将容易认识到，本发明公开的抗体可以容易地结合到本领域众所周知的已建立的试剂盒形式之一中。

[0138] II. 抗癌疗法

[0139] 在一些实施方案中，本文所述的组合物和方法可以与其他抗癌疗法联合或组合施用以治疗癌症。治疗有效剂量可由本领域技术人员确定，并取决于疾病的严重程度和病程、患者的健康和对治疗的反应、患者的年龄、体重、身高、性别、既往病史和治疗医生的判断。

[0140] 在本发明的一些方法中，癌细胞是肿瘤细胞。癌细胞可能在患者体内。患者可能患有实体瘤。在这种情况下，实施方案还可以包括例如通过切除全部或部分肿瘤对患者进行手术。可以在抗癌治疗之前、期间或之后施用本文所述的xCT VLP。可以在手术之前、之后或同时对患者进行抗癌治疗。在另外的实施方案中，也可以对患者进行直接地、经内窥镜、气管内、瘤内、静脉内、病变内、肌内、腹膜内、区域、经皮、局部地、动脉内、膀胱内或皮下给药。可以施用抗癌组合物1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或多于20次，可以每1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24小时或每1、2、3、4、5、6、7天或每1、2、3、4、5周或每1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12个月施用它们。

[0141] 治疗癌症的方法还可以包括向患者施用化学疗法或放射疗法，其可以施用多于一次。化学疗法包括但不限于多西他赛、顺铂(CDDP)、卡铂、甲基苄肼、氮芥、环磷酰胺、喜树碱、异环磷酰胺、美法仑、苯丁酸氮芥、双硫丹、亚硝基脲、放线菌素、柔红霉素、阿霉素、博来

霉素、plicomycin丝裂霉素、依托泊苷 (VP16)、他莫昔芬、紫杉特尔、紫杉醇、跨铂、5-氟尿嘧啶、长春新碱、长春花碱、甲氨蝶呤、吉西他滨、奥沙利铂、伊立替康、托泊替康或其任何类似物或衍生物。放射疗法包括但不限于X射线辐照、UV辐照、 γ -辐照、电子束辐照或微波。此外,作为本发明方法的一部分,可以向细胞或患者施用微管稳定剂,包括但不限于紫杉烷。特别考虑任何化合物或衍生物或类似物都可以与这些组合疗法一起使用。

[0142] 在一些实施方案中,施用本文所述组合物的癌症可以是膀胱、血液、骨、骨髓、脑、乳房、结肠直肠、食道、胃肠、头、肾、肝、肺、鼻咽、颈部、卵巢、胰腺、前列腺、皮肤、胃、睾丸、舌头或子宫细胞。在一些方面,癌症是乳腺癌。

[0143] III. 实施例

[0144] 包括以下实施例以及附图以说明本发明的优选实施方案。本领域技术人员应该理解的是,实施例或附图中公开的技术代表发明人发现的在本发明的实践中能够很好地起作用的技术,因此可以认为是构成其实践的优选模式。然而,根据本公开内容,本领域技术人员应当理解,在不脱离本发明的精神和范围的情况下,可以对所公开的具体实施方案进行许多改变并仍然获得相同或相似的结果。

[0145] 实施例1

[0146] 为了研究xCT VLP诱导的抗体是否会影响xCT功能和BCSC生物学,从对照VLP或xCT VLP治疗的小鼠血清中纯化了IgG。将来自指定sTNBC细胞系的BCSC富集的细胞与纯化的抗体一起孵育,并使用3D培养物分析BCSC的自我更新和增殖,同时通过FACS测量球体中aldefluor阳性细胞 (BCSC表型的标志物) 的频率和细胞间ROS水平 (xCT功能的指标)。如使用xCT灭活的其他方法 (siRNA、SASP处理和DNA疫苗接种) 所观察到的那样,xCT VLP诱导的IgG抗体降低了BCSC的自我更新、增殖并增加了ROS水平 (图1)。在用xCT VLP诱导的抗体处理的培养物中形成的肿瘤球中,BCSC的数量也显著减少。

[0147] 图1表明AX09 (RNA噬菌体VLP上展示的xCT表位) 诱导的抗体影响BCSC生物学并抑制人细胞中的xCT功能。将第1代MDA-MB-231衍生的肿瘤球解离并与在球体培养基中50 μ g/ml的从对照VLP或AX09处理的小鼠中分离的纯化的IgG一起重新接种 (4x10⁵/孔)。将不包含IgG的培养基用作对照。五天后分析培养物,每个测定重复三次。误差棒表示标准偏差,**表示t检验的p值小于0.01。(A) 为了分析BCSC的自我更新,对在3D培养中形成的继发肿瘤球的数量进行计数,并绘制为球体数/10³个接种细胞。(B) 用获得的球体图像评估BCSC增殖,并使用ImageJ软件计算平均球体直径的测量值。(C) 通过测量细胞间ROS水平评估AX09免疫血清抑制xCT功能的能力。将解离的球与2,7-二氢二氯荧光素二乙酸盐一起孵育,并通过FACS评估ROS水平。(D) 为了确定BCSC在肿瘤球中的频率,将球解离成单细胞悬浮液,并通过将细胞与ALDEFLUOR一起孵育并通过FACS分析细胞来分析醛脱氢酶活性。绘制ALDH阳性细胞的百分比 (肿瘤干细胞/祖细胞的指标)。

[0148] 纯化的IgG与三阴性乳腺癌衍生干细胞一起孵育的其他数据。从ECD6 VLP纯化的IgG和ECD3 VLP纯化的IgG两者和小鼠TUBO衍生的癌症干细胞。从ECD6 VLP纯化的IgG和ECD3 VLP纯化的IgG两者和小鼠4T1衍生的癌症干细胞。从ECD6 VLP纯化的IgG和ECD3 VLP纯化的IgG两者和人HTC1806衍生的癌症干细胞。从ECD6 VLP纯化的IgG和ECD3 VLP纯化的IgG两者和人MB-MDA 231衍生的癌症干细胞。

[0149] 单克隆抗体的制备

[0150] ECD3 Mab-标准行业规程用于制备抗ECD3和ECD6的抗体。免疫方案如下。

	第一次 免疫	第二次 免疫	第三次 免疫	测试采血	第四次 免疫	第五次 测试采血	第六次 免疫	第七次 测试采血	第八次 免疫	第九次 测试采血	第十次 免疫	最终加强
佐剂	CFA	IFA	IFA		IFA		IFA		IFA		IFA	无佐剂
VLP	10	10	10		10		10		10		10	10 μ g/小鼠
注射位置	SC	SC	SC		SC		SC		SC		SC	IP
注射日	0	21	35	45	49	59	63	73	77	87	91	101

[0152] 在II阶段结束时,未发现ECD6阳性杂交瘤克隆。本节的其余部分记录了ECD3的制备。

[0153] 最终加强免疫后的ELISA-(1) 抗原涂覆:步骤1:1xPBS中的链霉亲和素10.0 μ g/ml;涂覆量:50 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 2小时;然后用1x PBS洗涤孔三遍;步骤2:用于筛选的在1xPBS中生物素化的ECD3肽,10.0 μ g/ml;涂覆量:50 μ L/孔,4 $^{\circ}$ C过夜;然后用1xPBS洗涤孔3次。(2) 封闭:5%BSA/PBS,100 μ L/孔,室温2小时;(3) 一抗:第六次免疫的小鼠血清。50 μ L/孔,室温2小时。(4) 二抗:HRP标记的抗IgG:SIGMA,目录号:A0168,生产批号:097K4831;稀释:1:9000,50 μ L/孔,室温2小时。(5) 底物溶液:TMB,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 10分钟,在450nm下读取OD;(6) OD读取结果(双孔):

小鼠编号	抗血清					免疫前血清				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
1 : 10 ³	0.096	0.187	0.197	0.132	0.352	0.194	0.195	0.196	0.197	0.194
	0.117	0.184	0.190	0.119	0.344	0.195	0.192	0.194	0.193	0.192
1 : 10 ⁴	0.052	0.072	0.073	0.068	0.087	0.094	0.096	0.095	0.095	0.094
	0.071	0.073	0.078	0.068	0.089	0.091	0.092	0.090	0.092	0.093
1 : 10 ⁵	0.054	0.042	0.041	0.037	0.047	0.042	0.041	0.039	0.040	0.043
	0.052	0.046	0.047	0.045	0.044	0.040	0.038	0.041	0.037	0.040

[0155] 使用Agilvax已优化的肽ELISA评估xCT抗体反应。因此,使用优化的肽ELISA方案来测试最终的采血并选择继续进行测试的动物。

[0156] 使用ECD3肽的肽ELISA

肽选择	ECD3 抗血清 (ProMab)					ECD3 免疫前血清 (ProMab)					IM ECD3	
	动物1	动物2	动物3	动物4	动物5	动物1	动物2	动物3	动物4	动物5	Agilvax	无
500	1.65	0.29	0.84	0.1	3.93	0.051	0.1	0.07	0.04	0.07	4.01	0.04
1.35E+04	0.95	0.04	0.04	0.03	0.08	0.04	0.04	0.04	0.07	0.04	0.42	0.04

[0158] 肽ELISA:将ELISA板与PBS中的1 μ g亲和素 (pH 7.5) 在37 $^{\circ}$ C下孵育2小时。洗涤后,将SMPH以2 μ g/孔的量添加到孔中,并在37 $^{\circ}$ C下孵育2小时。将ECD3肽(在其C端包含反应性半胱氨酸残基)以2 μ g/孔的量添加到孔中,并在4 $^{\circ}$ C下孵育过夜。在室温下,用0.5%PBS中的牛奶将板封闭1小时,向每个孔中加入血清的3倍稀释液(从1:500开始,至1:13500结束),并孵育2小时。用HRP标记的山羊抗小鼠IgG (1:5000) 探测孔1小时。用TMB进行反应1小时,并用1%HC1终止。血清对ECD3的反应性通过测量450nm处的光密度来确定。对照来自BALB/c雌性小鼠 (4/6周龄),在无外源性佐剂的情况下用5 μ g ECD3 VLP免疫(肌内),并在14天后用相同制剂加强免疫。14天后,收集血清。这代表使用具有ECD3的典型免疫方案的典型抗体反应的范围。

[0159] 根据该数据,选择5号动物进行杂交瘤融合并随后使用ECD3 ELISA测试IgG克隆。

[0160] ECD3杂交瘤上清液的测试。ECD3 (94653):所有针对ECD3 VLPS和MST野生型的克

隆。一个克隆对ECD3 VLPS呈阳性,而对MST野生型呈阴性。此外,所有克隆均对生物素化的ECD3肽呈弱阳性。存在少于50个克隆。

[0161] VLP单克隆抗体制备的免疫方案。在这项研究中,使用的免疫方案和给药途径产生在癌症干细胞研究中抑制xCT功能的IgG抗体。通过向右尾大腿肌肉(IM)注射10μg不加佐剂的VLP,用各种xCT VLP免疫每组5只雌性BALB/c小鼠(4至8周龄),然后四周后加强免疫。

[0162] 在加强免疫前一天收集来自下颌下静脉的血液,并将一份未稀释的血清与一份来自每只动物的免疫前血清一起用于ELISA。加强免疫后2周进行第二次血液收集,并收集未稀释的血清。如果滴度可接受,约 10^5 ,采用优化的肽ELISA测定,则使用具有最佳滴度的鼠脾细胞完成杂交瘤融合。

[0163] 如果滴度低于可接受的水平,则在第7至8周再进行一次加强免疫,然后在2周后再进行一次采血。杂交瘤融合是使用具有最佳滴度的鼠脾细胞完成的。

[0164] xCT DNA免疫后进行VLP促进Mab制备。可以将不同的方法用于开发治疗性xCT ECD靶向单克隆抗体。

[0165] 在8只BALB/c小鼠中使用基于小鼠DNA质粒的疫苗进行体内电穿孔,以引发整体xCT抗体应答,在10天后进行第二次DNA质粒加强。为了加强并靶向针对xCT ECD的抗体应答,通过向右尾大腿肌肉(IM)注射10μg不加佐剂的VLP,将具有特异性xCT ECD的VLP用于免疫接种,然后在四周后进行增强。每个xCT VLP 2只小鼠用于指定的VLP加强免疫。

[0166] 在第0天和第10天给八只BALB/c雌性小鼠接种疫苗。疫苗包括(a) 50μg/20μL/小鼠的DNA电穿孔(电穿孔仪设置:低电压;每300毫秒2个脉冲;间隔25秒,150V)和(b)小鼠.I.M.注射10μg VLP-ECD6(总体积:50μL)。在VLP加强之前收集血清,VLP加强=2。VLP包括AX09(MS2 ECD6)、Q-βAX09(ECD6)、AX10(MS2 NECD3)和MS2 NECD1。

[0167] 最终加强免疫后两周,在加强免疫后2周收集来自下颌下静脉的血液,并将血清用于xCT筛选。来自血清的FACS分析用于测试疫苗接种方案是否引发了与4T1细胞的xCT胞外区结合的抗体。杂交瘤融合是使用具有xCT结合特性的鼠脾细胞完成的。

[0168] xCT单克隆抗体数据

[0169] 基于VLP的单克隆抗体制备。为了开发治疗性xCT ECD3靶向的mAb,将10只BALB/c小鼠用AX09-0M3 VLP(NECD3)引发,以引发抗体应答。根据给药途径,动物接受2次或3次AX09-0M3 VLP加强免疫,并对每个测试采血进行肽ELISA,以监测抗体滴度。

[0170] 使用标准行业协议和Agilvax的标准协议来制备抗NECD3的抗体。由于内部测试,加强#3(S.C./I.P.)和加强#2(I.M.)偏离标准的2周或4周间隔。免疫方案如下。

[0171] S.C./I.P.

[0172]

	采血前	引发	加强#1	测试采血#1	加强#2	测试采血#2	加强#3	测试采血#3
VLP		50μg	25μg		25μg		25μg	
注射位置		SC	IP		SC		IP	
注射日	-4	0	14	21	28	35	104	111

[0173] 动物5879和5880:铝佐剂

[0174] 动物5881和5882:CEA/IFA佐剂

[0175] I.M.

[0176]

	采血前	引发	加强#1	测试采血#1	加强#2	测试采血#2	最终加强	细胞融合
VLP		10μg	10μg		10μg		10μg	

注射位置		IM	IM		IM		IM	
注射日	-4	0	28	42	104	111	193	最终加强+4天

[0177] 动物5873-5878:无佐剂

[0178] 加强#2或#3后的肽ELISA。ELISA抗原:(A) N末端生物素化的ECD3肽(0.5μg/mL, 100 μl/孔);涂覆浓度(链霉亲和素):2μg/mL;涂覆缓冲液:磷酸盐缓冲盐水,pH 7.4;二抗:过氧化物酶-亲和纯的山羊抗小鼠IgG,与Fc γ 片段特异性反应(经人、牛、马血清蛋白吸附)

[0179] S.C./I.P.(测试采血#3)

[0180]

动物	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		
稀释	1:1 000	1:2 000	1:4 000	1:8 000	1:16 000	1:32 000	1:64 000	1:128 000	1:256 000	1:512 000	空白	滴度	涂覆
No.5879	2.806	3.013	2.879	2.873	2.723	2.329	2.048	1.471	0.974	0.589	0.046	>1:512 000	A
No.5880	2.878	3.036	2.841	2.799	2.606	2.351	1.732	1.407	0.931	0.528	0.047	>1:512 000	A
No.5881	3.216	3.291	3.117	2.833	2.617	2.308	1.822	1.341	0.937	0.626	0.056	>1:512 000	A
No.5882	2.893	3.002	2.982	2.671	2.285	1.945	1.436	0.986	0.673	0.421	0.050	1:512 000	A

[0181] I.M(测试采血#2)

[0182] 滴度是S/B(信号/空白) ≥ 2.1时的最高稀释度

[0183] I.M(测试采血#2)

[0184]

动物	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		
稀释	1:1 000	1:2 000	1:4 000	1:8 000	1:16 000	1:32 000	1:64 000	1:128 000	1:256 000	1:512 000	空白	滴度	涂覆
No.5873	3.055	2.985	2.775	2.706	2.503	2.154	1.571	1.082	0.667	0.387	0.048	1:512 000	A
No.5874	3.022	3.043	2.908	2.781	2.609	2.256	1.803	1.112	0.823	0.471	0.047	1:512 000	A
No.5875	3.125	2.941	2.879	2.769	2.499	2.065	1.568	1.017	0.647	0.371	0.049	1:512 000	A
No.5876	3.123	2.967	2.981	2.766	2.491	2.148	1.611	1.163	0.734	0.415	0.049	1:512 000	A
No.5877	3.011	2.952	2.870	2.685	2.506	2.134	1.717	1.227	0.817	0.466	0.049	1:512 000	A
No.5878	2.820	2.867	2.813	2.619	2.412	2.141	1.734	1.167	0.811	0.459	0.047	1:512 000	A

[0185] Agilvax已优化肽ELISA以用于评估xCT抗体反应。

[0186]

VLP	动物#	EPT (9-1-17)	EPT (10-24-17)	给药途径
AX09-OM3	5873	9.84E+06	9.84E+06	i.m
AX09-OM3	5874	9.84E+06	9.84E+06	i.m
AX09-OM3	5875	2.95E+07	9.84E+08	i.m
AX09-OM3	5876	2.95E+07	3.28E+06	i.m
AX09-OM3	5677	2.95E+07	9.84E+06	i.m
AX09-OM3	5878	2.95E+07	9.84E+06	i.m
AX09-OM3	5879	2.95E+07	9.84E+06	s.c./i.p
AX09-OM3	5880	2.95E+07	9.84E+06	s.c./i.p
AX09-OM3	5881	2.95E+07	9.84E+06	s.c./i.p
AX09-OM3	5882	9.84E+06	3.28E+06	s.c./i.p

[0187] *突出标记的动物在IF实验中产生了阳性结果(见下文)。

[0188] 根据该数据,选择动物5875用于使用脾细胞进行杂交瘤融合,并随后使用ECD3 ELISA测试IgG克隆。

[0189] 肽ELISA:将总共200μL的500ng N末端生物素化的hNECD3肽添加到预封闭的NeutrAvidin涂覆的96孔ELISA板中,并在4℃孵育过夜。次日早晨,用含有0.05%吐温-20的PBS中的Blocker BSA洗涤板,并将其与稀释的血清(从1:500(9-1-17)或1:1500(10-24-17)

开始的3倍稀释液)一起孵育,在室温下摇动2小时。用Blocker BSA洗涤孔。将HRP标记的山羊抗小鼠IgG (1:5000)加入孔中,并在室温下摇动孵育1小时。洗涤孔并加入200 μ L的TMB可溶物(Calbiochem),并在室温下摇动孵育1小时。加入100 μ L 2% HCl终止反应,并在450nm处读数。终点滴度确定为OD450值,其是背景值的2倍(合并的免疫前血清)。

[0190] 获得了与接种AX09-0M3的BALB/c小鼠血清孵育的4T1上皮细胞的免疫荧光图像。将过夜接种在玻璃盖玻片上的4T1上皮细胞在4%福尔马林中固定,并与血清以1:10稀释度在室温下孵育1小时。与Alexa Fluor488缀合的抗小鼠IgG1二抗在室温下孵育1小时后,检测到特定信号(绿色荧光)。细胞核用DAPI(蓝色)复染。与上述抗血清样品相对应的来自动物的血清前样品未显示任何特异性信号。

[0191] AX09-0M3杂交瘤上清液的测试。

[0192] 一级和验证性肽ELISA筛选。ELISA抗原:N末端生物素化的ECD3肽(0.5 μ g/mL,100 μ L/孔);涂覆浓度(链霉亲和素):5 μ g/mL;涂覆缓冲液:磷酸盐缓冲盐水,pH 7.4;二抗:过氧化物酶-亲和纯的山羊抗小鼠IgG,与Fc γ 片段特异性反应(经人、牛、马血清蛋白吸附)

[0193] 一级ELISA:筛选4800个克隆上清液与hNECD3肽的结合。从该筛选中总共选择了388个阳性克隆(OD450>1.0)以用于二级验证性ELISA。

[0194] 验证性ELISA:如果OD450>2.5,则认为克隆为阳性。选择阳性克隆用于扩增和上清液收集。来自146个亲本克隆的上清液被送至Agilvax进行进一步测试,并确定哪些克隆将继续进行亚克隆。

[0195] VLP竞争型ELISA。VLP竞争型ELISA。将总共100 μ L的AX09-0M3或MS2 VLP加到Immulon II 2HB 96孔ELISA板中,并在4 $^{\circ}$ C孵育过夜。次日早晨,将板用1xPBS洗涤,并用1xPBS中的0.5%牛奶封闭。在封闭过程中,将稀释的克隆上清液(1:10)或对照血清与过量的MS2 VLP孵育。洗涤板,并与稀释的克隆上清液或对照血清一起在室温下摇动孵育1.5小时。洗涤后,将HRP标记的山羊抗小鼠IgG加入孔中,并在室温下摇动孵育1小时。洗涤孔并加入100 μ L的TMB可溶物,并在室温下摇动孵育1小时。加入50 μ L 2% HCl终止反应,并在450nm处读数。

[0196]	AX09-0M3 VLP的OD450	#克隆的数量
	>2.0	71
	>1.0且<2.0	10
	>0.5且<1.0	15
	>0.1且<0.5	24
	<0.1	26

[0197] 通过竞争型ELISA的初步筛选鉴定了71个与AX09-0M3 VLP结合且OD450值 $\geq$ 2.0的克隆上清液。在这71个克隆上清液中,有55个上清液的OD450读数>4.0,11个上清液的OD450读数>3.0且<4.0,5个上清液的OD450读数>2.0且<3.0。为了进一步选择克隆上清液以继续进行亚克隆,将OD450读数>0.100的所有克隆用于IgG ELISA。用该ELISA测定的IgG总量来归一化VLP ELISA OD450读数。

[0198] IgG ELISA。

[0199]

前32个克隆

	克隆 ID	OD450-VLP ELISA	OD/IgG (ng)	
1	18C1	4.156	1.309	
	27D10	4.114	1.194	
	12D3	4.056	1.065	
	14B3	4.068	1.064	
	7C1	4.098	1.034	
	3H2	4.188	0.943	
	10E12	4.086	0.839	
	5E12	4.156	0.819	
	22G8	4.092	0.771	
	10	4H6	4.113	0.752
		38H4	4.192	0.744
22D4		4.169	0.709	

	克隆 ID	OD450-VLP ELISA	OD/IgG (ng)	
13	33C1	4.096	0.695	
	28H11	4.139	0.628	
	10G6	4.017	0.616	
	12E9	4.064	0.579	
	22A2	4.048	0.571	
	18C11	4.195	0.580	
	21D3	4.093	0.539	
	20	1A8	1.989	0.519
		12D5	2.591	0.511
		17H12	4.249	0.506
		41D10	0.273	0.497
7F7		4.083	0.488	

	克隆 ID	OD450-VLP ELISA	OD/IgG (ng)
25	10A12	4.144	0.480
	21B8	4.136	0.447
30	18A11	4.098	0.447
	3D6	3.960	0.440
	17F10	4.014	0.438
	18G8	3.884	0.437
	35G5	4.116	0.438
	24B9	4.154	0.430

[0199]

[0200] 将稀释的120个克隆上清液(1:10或1:50)和小鼠IgG标准液添加到小鼠IgG特异性抗体涂覆的孔中,并在室温(RT)摇动下孵育2小时。用1x洗涤缓冲液洗涤孔两次。按照制造商的说明将HRP标记的山羊抗小鼠检测抗体稀释,添加到孔中,并在室温下摇动孵育1小时。用1x洗涤缓冲液洗涤3次后,加入HRP显影液-TMB,并在室温下孵育。监测颜色变化,并在三个不同的时间点(在630nm处分别为约3、7和11分钟)读取板,以确保读数在标准曲线范围内。在15分钟时,用终止溶液终止反应,并在450nm下读板。在Excel中创建具有线性趋势线的IgG标准曲线(可接受的 $R^2 > 0.98$),并用于确定IgG (ng)/克隆上清液的量。小鼠IgG标准品一式两份完成,而克隆上清液仅使用单一孔。上面仅列出了前32个的结果。

[0201] 克隆上清液中IgG的量为0.549ng至12.510ng(数据未显示)。归一化(OD/ng IgG)后,使用0.430的临界值确定了选择进行亚克隆的32个克隆。在开始亚克隆之前,恢复亲本克隆并通过ELISA测试其与hNECD3肽的结合。

[0202] 肽ELISA亲本克隆上清液。通过肽ELISA的筛选显示,细胞恢复后,所有亲本克隆上清液与hNECD3肽结合,其中28个克隆显示OD450值 > 2.0 。选择28个克隆进行一轮亚克隆。为了获得与靶抗原的结合,使用肽ELISA(初步筛选)评估所得的亚克隆上清液,并通过FACS或IF(二次筛选)进行评估。

[0203] 肽ELISA-亚克隆上清液。从每个亲本克隆获得一至三个亚克隆。通过肽ELISA的筛选显示,亚克隆后所有73个亚克隆上清液均结合到hNECD3肽上,并且OD450值 > 2.0 。亚克隆名称=亲本克隆-亚克隆(即14B3-C3)。为了进一步表征亚克隆,测定了IgG的浓度和抗体同种型。

[0204] IgG浓度-亚克隆上清液。所有克隆上清液均包含可检测的IgG。克隆上清液中的IgG浓度范围为0.057 μ g/mL至1.398 μ g/mL。亚克隆名称=亲本克隆-亚克隆(即,14B3-C3)。

[0205] 同种型分析-亚克隆上清液。该分析识别出,除了属于IgM(κ)同种型的一个亚克隆10G6-B9外,每个测试的亚克隆都存在属于IgG(κ)同种型的抗体。在IgG(κ)亚克隆中,有12个被识别为IgG1,38个被识别为IgG2a,22个被识别为IgG2b。

[0206] 实施例2

[0207] 抗xCT的单克隆抗体的生成。将雌性BALB/c小鼠(Charles River实验室)保存在都灵大学分子生物技术中心,并根据大学道德委员会和欧洲指南2010/63的规定对其进行了处理。疫苗接种包括pVAX1-xCT DNA质粒(编码全长小鼠xCT蛋白)的一种肌肉电穿孔,如先前所述(Lanzardo等人,2016)。从DNA疫苗接种后的第10天开始,每月用AX09-0M3 VLP(抗人xCT蛋白的第三个胞外域;ECD3)加强免疫小鼠6次。在第一次VLP疫苗接种之前对小鼠采血,然后在每次疫苗接种后两周放血,并收集血清并将其保存在-20 $^{\circ}$ C下用于随后的分析。

[0208] 为了测试接种疫苗诱导的抗体的功能效果,将富含xCT+癌干细胞(CSC)的4T1衍生

的肿瘤球与单独的培养基、xCT药理学抑制药柳氮磺吡啶 (SASP, 50 μ M)、或1:50稀释的接种或未接种小鼠血清孵育5天。球体生成能力报告为肿瘤球数/ 10^3 个接种的细胞(图7)。接种了AX09-0M3的小鼠的血清能够显著降低4T1细胞的球体生成能力,这表明存在能够干扰xCT功能的抗体。

[0209] 为了证实抗xCT抗体的存在,第三次疫苗接种后通过ELISA进行测试收集的血清样品。简而言之,将总共200 μ L的500ng N末端生物素化的hNECD3肽添加到预封闭的NeutrAvidin涂覆的96孔ELISA板中,并在4 $^{\circ}$ C孵育过夜。次日早晨,用含有0.05%吐温-20的PBS中的Blocker BSA洗涤板,并将其与来自个体动物的稀释的血清(从1:500开始至1:8.86 $\times 10^7$ 结束的3倍稀释液)一起在室温下摇动孵育2小时。用Blocker BSA洗涤孔。将HRP标记的山羊抗小鼠IgG(1:5000)加入孔中,并在室温下摇动孵育1小时。洗涤孔并加入200 μ L的TMB可溶物(Calbiochem),并在室温下摇动孵育1小时。加入100 μ L 2% HCl终止反应,并在450nm处读板。终点滴度确定为OD450值,其是背景值的2倍(未处理或MS2血清)。这代表使用具有ECD3的Agilvax典型免疫方案的典型抗体反应的范围。小鼠B5的血清显示更高的终点滴度(9.84E+06)。

[0210] 肽ELISA终点滴度(第3次VLP给药后收集的血清)。

		稀释											
VLP	动物 #	5.00E+02	1.50E+03	4.50E+03	1.35E+04	4.05E+04	1.22E+05	3.65E+05	1.09E+06	3.28E+06	9.84E+06	2.95E+07	8.86E+07
AX09-0M3	Bn.1	4.380	4.305	4.278	4.246	4.163	3.489	1.370	0.506	0.199	0.096	0.061	0.052
AX09-0M3	Bn.3	4.338	4.365	4.345	4.278	4.131	2.028	0.749	0.297	0.130	0.078	0.064	0.051
AX09-0M3	Bn.5	4.332	4.359	4.291	4.278	4.204	3.371	1.343	0.504	0.204	0.101	0.064	0.054
PBS	合并	0.226	0.114	0.083	0.073	0.061	0.057	0.058	0.060	0.054	0.050	0.048	0.049

VLP	动物	EPT
AX09-0M3	Bn.1	3.28E+08
AX09-0M3	Bn.3	3.28E+06
AX09-0M3	Bn.5	9.84E+06

[0212] 基于这些结果,选择小鼠B5号以生成单克隆抗体。

[0213] 为了生成单克隆抗体,将脾细胞与NS-1骨髓瘤细胞以3:1的比例在补充有10%FCS血清和HAT溶液(Ipoxantine 100 μ M、Timidine 16 μ M和氨基喋呤0.04 μ M)的DMEM培养基中混合。将100 μ L总共包含150000个细胞接种在十五个96孔微量滴定板的每个孔中。10天后,对其中细胞生长明显的孔的上清液进行ELISA测试。96孔板涂有抗原(100 μ L的1 μ g/ml xCT鼠(m)ECD3肽溶液),并在4 $^{\circ}$ C下孵育过夜。将板用PBS洗涤3次,并在室温下用200 μ L 3%的PBS中的BSA饱和封闭1小时。将孔用PBS洗涤3次,向每个孔中加入70 μ L上清液,并在室温下孵育1小时。用PBS洗涤5次后,在每个孔中添加50 μ L的1:4000稀释度的山羊产生的抗小鼠IgG(整个分子)-过氧化物酶抗体(SIGMA),并在室温下孵育1小时。在用PBS洗涤孔5次之后,将70 μ L的TMB(四甲基联苯胺,Sigma T0440)显示溶液添加到每个孔中。该混合物呈黄色,并使用Gliomax Multi Plus检测系统(Promega)通过在OD450nm读取96孔板来评估其强度。选择阳性克隆,使其生长并再次在ELISA中进行筛选。经过三轮ELISA筛选后,鉴定出21个阳性克隆并冷冻。

[0214] Bn.5免疫小鼠杂交瘤克隆上清液的FACS分析

克隆	I Elisa	II Elisa	III Elisa
1D12	0.46	0.87	0.4
2A11	0.92	1.32	0.55
2D10	0.48	0.46	0.53
3E7	0.42	0.59	0.43
3E10	0.62	0.43	0.38
3F11	0.63	1.03	0.75
5B10	0.6	1.01	1.03
5E2	0.52	1.09	1.35
6B8	0.97	0.89	0.64
7A7	0.67	0.65	0.68
8F2	0.78	1.04	0.62
7H6	1.03	1.28	0.7
9C11	0.92	1.3	0.87
9E9	0.49	0.55	0.65
10B9	0.42	0.73	0.86
11D1	0.55	0.54	0.96
11C6	0.78	1.39	0.78
12G9	0.44	1.2	0.63
13G8	0.98	1.25	0.56
14C2	0.56	1.53	1.6
15F5	0.53	1.14	1.2

[0216] 通过免疫荧光 (IF) 在衍生自4T1 (4T1-P1) 和HCC1806 (HCC1806-P1) 的肿瘤球上测试了21个杂交瘤克隆。对于IF分析,将 2×10^5 个肿瘤球/样品细胞移植到载玻片上,在4%甲醛中固定,然后与100 μ l未稀释杂交瘤克隆的培养上清液在室温下孵育1小时。然后,将山羊抗小鼠Ig (H+L) AlexaFluor-488用作二抗 (Life Technologies)。兔抗xCT抗体 (PA1-16775; Thermo Fisher) 用作阳性对照,其使用事先用0.2% TritonX-100透化的胞嘧啶固定的肿瘤球。然后,将山羊抗兔AlexaFluor-538用作二抗 (Life Technologies)。在ApoTome系统和AxioVision Release 4.8软件 (Zeiss) 上获取图像。将在4T1-P1和HCC1806-P1上均产生IF阳性的样品即克隆5E2、8F2、7H6、11D1、11C6和14C2融化并再次通过ELISA进行测试。

[0217] 根据ELISA和IF分析,选择11D1克隆,并通过在3个96孔微量滴定板中每孔接种1个细胞来进行亚克隆。获得了61个克隆,并且有5个克隆在ELISA中针对mECD3肽呈阳性,即:11D1/C3;11D1/H7;11D1/E7;11D1/E5;11D1/H10。接下来通过使用人xCT蛋白进行ELISA分析 (图8) 和通过使用HCC1806-P1进行新的IF分析,选择了三个亚克隆:H10、C3和E7,并通过ELISA针对人xCT ECD3肽 [1 μ g/mL] 进行了测试 (图9)。根据该ELISA,选择H10 (此处称为11D1/H10) 作为具有更好的产生抗xCT Ig的能力的亚克隆。为了区分11D1/H10的上清液中存在何种Ig同种型,使用了Pierce快速同种分型试剂盒 (#26178; Thermo Scientific) (图10)。

[0218] 使11D1/H10克隆杂交瘤细胞在生物反应器 (CELLINE 1000 WHEATON) 中生长以获得高Ab滴度。每周一次,持续4周,取10mL浓缩上清液并通过FACS测试其对4T1 P2肿瘤球染色的能力。然后,从3mL蛋白A-琼脂糖上的11D1/H10上清液中纯化Ig。以0.7mg/mL的浓度获得1.5mL的纯化的单克隆抗体,并使用Pierce快速ELISA小鼠mAb同种分型试剂盒 (#37503; Invitrogen) 和Pierce快速同种分型试剂盒 (#26178; ThermoScientific) 进行测试,以便鉴定Ig同种型 (图11)。这些数据表明11D1/H10不是克隆,而是包含产生不同Ig同种型的细胞。因此,对11D1/H10进行亚克隆,获得30个新克隆,然后通过ELISA进行测试。这些克隆中有五个针对xCT产生分泌Ig (ELISA O.D.450 $\geq$ 0.400)。测试了来自这些亚克隆 (A1、A5、B9、D5、和

E1)的培养物上清液中是否存在抗xCT Ig或Ig同种型(图12至图16)。在此步骤中,使用三种不同的方法测试了Ig同种型:ELISA(如前所述,使用人xCT ECD3);Pierce快速ELISA小鼠mAb同种分型试剂盒(#37503;Invitrogen);Pierce快速同种分型试剂盒(#26178;ThermoScientific)。对于每个测试的亚克隆,该分析确定了属于IgM(κ)同种型的特异性抗xCT抗体的存在。对这些亚克隆进行抗体全长测序。所有五个克隆的序列均相同,并且代表性序列包括:

[0219] 抗体H1E1的重链DNA序列在SEQ ID NO:13中。SEQ ID NO:13编码重链:SEQ ID NO:14的氨基酸序列(595个氨基酸),其具有氨基酸为SEQ ID NO:15的CDR1;氨基酸为SEQ ID NO:16的CDR2;和氨基酸为SEQ ID NO:17的CDR3。

[0220] 轻链:抗体H1E1的DNA序列(708bp)在SEQ ID NO:18中,其编码轻链:具有CDR1、CDR2和CDR3的SEQ ID NO:19的氨基酸序列(235个氨基酸),其中CDR1具有氨基酸序列SEQ ID NO:20,CDR2具有氨基酸序列SEQ ID NO:21,CDR3具有氨基酸序列SEQ ID NO:22。

[0221] 材料-H1E1杂交瘤细胞;**TRIzol®**试剂(Ambion,目录编号:15596-026);PrimeScript™第一链cDNA合成试剂盒(Takara,目录编号:6110A)。

[0222] 方法-按照**TRIzol®**试剂技术手册从杂交瘤细胞中分离总RNA。然后根据PrimeScript™第一链cDNA合成试剂盒的技术手册,使用同种型特异性反义引物或通用引物将总RNA反转录为cDNA。根据GenScript的cDNA末端快速扩增(RACE)的标准操作程序(SOP)扩增了VH、VL、CH和CL的抗体片段。将扩增的抗体片段分别克隆到标准克隆载体中。进行菌落PCR以筛选具有正确大小的插入片段的克隆。针对每个片段,对不少于五个带有正确大小插入物的菌落进行测序。比对不同克隆的序列并提供共有序列。

序列表

<110> 阿吉尔瓦克斯公司
 <120> 与xCT抗体相关的组合物和方法
 <130> AVAX. P0015W0
 <140> 还未分配
 <141> 2018-04-30
 <150> US 62/492,912
 <151> 2017-05-01
 <160> 22
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 501
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 1

Met Val Arg Lys Pro Val Val Ser Thr Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Leu
 1 5 10 15

[0001] Gln Gly Asn Val Asn Gly Arg Leu Pro Ser Leu Gly Asn Lys Glu Pro
 20 25 30

Pro Gly Gln Glu Lys Val Gln Leu Lys Arg Lys Val Thr Leu Leu Arg
 35 40 45

Gly Val Ser Ile Ile Ile Gly Thr Ile Ile Gly Ala Gly Ile Phe Ile
 50 55 60

Ser Pro Lys Gly Val Leu Gln Asn Thr Gly Ser Val Gly Met Ser Leu
 65 70 75 80

Thr Ile Trp Thr Val Cys Gly Val Leu Ser Leu Phe Gly Ala Leu Ser
 85 90 95

Tyr Ala Glu Leu Gly Thr Thr Ile Lys Lys Ser Gly Gly His Tyr Thr
 100 105 110

Tyr Ile Leu Glu Val Phe Gly Pro Leu Pro Ala Phe Val Arg Val Trp
 115 120 125

Val Glu Leu Leu Ile Ile Arg Pro Ala Ala Thr Ala Val Ile Ser Leu

	130	135	140	
	Ala Phe Gly Arg Tyr	Ile Leu Glu Pro Phe	Phe Ile Gln Cys Glu Ile	145 150 155 160
	Pro Glu Leu Ala Ile	Lys Leu Ile Thr Ala Val	Gly Ile Thr Val Val	165 170 175
	Met Val Leu Asn Ser	Met Ser Val Ser Trp Ser	Ala Arg Ile Gln Ile	180 185 190
	Phe Leu Thr Phe Cys	Lys Leu Thr Ala Ile	Leu Ile Ile Ile Val Pro	195 200 205
	Gly Val Met Gln Leu	Ile Lys Gly Gln Thr	Gln Asn Phe Lys Asp Ala	210 215 220
	Phe Ser Gly Arg Asp	Ser Ser Ile Thr Arg	Leu Pro Leu Ala Phe Tyr	225 230 235 240
[0002]	Tyr Gly Met Tyr Ala	Tyr Ala Gly Trp Phe	Tyr Leu Asn Phe Val Thr	245 250 255
	Glu Glu Val Glu Asn	Pro Glu Lys Thr Ile	Pro Leu Ala Ile Cys Ile	260 265 270
	Ser Met Ala Ile Val	Thr Ile Gly Tyr Val	Leu Thr Asn Val Ala Tyr	275 280 285
	Phe Thr Thr Ile Asn	Ala Glu Glu Leu Leu	Leu Ser Asn Ala Val Ala	290 295 300
	Val Thr Phe Ser Glu	Arg Leu Leu Gly Asn	Phe Ser Leu Ala Val Pro	305 310 315 320
	Ile Phe Val Ala Leu	Ser Cys Phe Gly Ser	Met Asn Gly Gly Val Phe	325 330 335
	Ala Val Ser Arg Leu	Phe Tyr Val Ala Ser	Arg Glu Gly His Leu Pro	340 345 350
	Glu Ile Leu Ser Met	Ile His Val Arg Lys	His Thr Pro Leu Pro Ala	355 360 365

Val Ile Val Leu His Pro Leu Thr Met Ile Met Leu Phe Ser Gly Asp
370 375 380

Leu Asp Ser Leu Leu Asn Phe Leu Ser Phe Ala Arg Trp Leu Phe Ile
385 390 395 400

Gly Leu Ala Val Ala Gly Leu Ile Tyr Leu Arg Tyr Lys Cys Pro Asp
405 410 415

Met His Arg Pro Phe Lys Val Pro Leu Phe Ile Pro Ala Leu Phe Ser
420 425 430

Phe Thr Cys Leu Phe Met Val Ala Leu Ser Leu Tyr Ser Asp Pro Phe
435 440 445

Ser Thr Gly Ile Gly Phe Val Ile Thr Leu Thr Gly Val Pro Ala Tyr
450 455 460

Tyr Leu Phe Ile Ile Trp Asp Lys Lys Pro Arg Trp Phe Arg Ile Met
465 470 475 480

[0003] Ser Glu Lys Ile Thr Arg Thr Leu Gln Ile Ile Leu Glu Val Val Pro
485 490 495

Glu Glu Asp Lys Leu
500

<210> 2
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成肽

<400> 2

Ser Pro Lys Gly Val Leu Gln Asn Thr Gly
1 5 10

<210> 3
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成肽

<400> 3

Arg Pro Ala Ala Thr Ala Val Ile Ser Leu Ala Phe Gly Arg Tyr Ile
1 5 10 15

Leu Glu Pro Phe Phe Ile Gln Cys
20

<210> 4

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成肽

<400> 4

Met Gln Leu Ile Lys Gly Gln Thr Gln Asn Phe Lys Asp Ala Phe Ser
1 5 10 15

Gly Arg Asp Ser Ser Ile Thr Arg
20

[0004]

<210> 5

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成肽

<400> 5

Ala Tyr Phe Thr Thr Ile Asn Ala Glu Glu Leu Leu Leu Ser Asn Ala
1 5 10 15

Val Ala Val Thr Phe Ser Glu Arg Leu Leu Gly Asn Phe Ser Leu
20 25 30

<210> 6

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成肽

<400> 6

Tyr Ser Asp Pro Phe Ser

1 5

<210> 7
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成肽

<400> 7

Ser Pro Lys Gly Val Leu Gln Asn Thr Gly Ser Val Gly Met Ser Leu
1 5 10 15

Thr Ile Trp Thr
20

<210> 8
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成肽

[0005]

<400> 8

Ile Leu Glu Pro Phe Phe Ile Gln Cys Glu Ile Pro Glu Leu
1 5 10

<210> 9
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成肽

<400> 9

Lys Gly Gln Thr Gln Asn Phe Lys Asp Ala Phe Ser Gly Arg Asp Ser
1 5 10 15

Ser Ile Thr Arg Leu Pro
20

<210> 10
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成肽

<400> 10

Tyr Phe Thr Thr Ile Asn Ala Glu Glu Leu Leu Leu Ser Asn Ala Val
 1 5 10 15

Ala Val Thr Phe Ser Glu Arg Leu Leu Gly
 20 25

<210> 11

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成肽

<400> 11

Gly Asp Leu Asp Ser Leu Leu Asn
 1 5

[0006]

<210> 12

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成肽

<400> 12

Leu Tyr Ser Asp Pro Phe Ser Thr
 1 5

<210> 13

<211> 1788

<212> DNA

<213> 小家鼠

<400> 13

atggaatgga gctgggtctt tctcttcctc ctgtcagtaa ctgcaggtgt ccaatcccag 60

gttcaactgc agcagtcctgg ggctgagctg gtgaggcctg gggcttcagt gaagctgtcc 120

tgcaaggctt tgggctacac atttactgac tatgaaatgc actgggtgaa gcagacacct 180

gtgcatggcc tggaatggat tggagctatt catccaggaa gtggtggtac tgcctacaat 240

cagaagttca agggcaaggc cacactgact gcagacaaat cctccagcac agcctacatg 300

gagctcagca gcctgacatc tgaggactct gctgtctatt actgtacaag acccctctac 360

	tataggtacc cttactactt tgactactgg ggccaaggca ccactctcac agtctcctca	420
	gagagtcagt ccttcccaaa tgtcttcccc ctctgtctcct gcgagagccc cctgtctgat	480
	aagaatctgg tggccatggg ctgccctggc cgggacttcc tgcccagcac catttccttc	540
	acctggaact accagaacaa cactgaagtc atccagggtta tcagaacctt cccaacactg	600
	aggacagggg gcaagtacct agccacctcg cagggtgtgc tgtctcccaa gagcatcctt	660
	gaaggttcag atgaatacct ggtatgcaaa atccactacg gaggcaaaaa cagagatctg	720
	catgtgcccc ttccagctgt cgcagagatg aaccccaatg taaatgtgtt cgtcccacca	780
	cgggatggct tctctggccc tgcaccacgc aagtctaaac tcactctgca ggccacgaac	840
	ttcactccaa aaccgatcac agtatcctgg cttaaaggatg ggaagctcgt ggaatctggc	900
	ttcaccacag atccggtgac catcgagaac aaaggatcca caccctaaac ctacaaggtc	960
	ataagcacac ttaccatctc tgaaatcgac tggctgaacc tgaatgtgta cacctgccgt	1020
	gtggatcaca ggggtctcac cttcttgaag aacgtgtcct ccacatgtgc tgccagtccc	1080
	tccacagaca tcctaacctt caccatcccc cctctctttg ccgacatctt cctcagcaag	1140
	tccgctaacc tgacctgtct ggtctcaaac ctggcaacct atgaaacct gaatatctcc	1200
[0007]	tgggcttctc aaagtggatg accactggaa accaaaatta aaatcatgga aagccatccc	1260
	aatggcacct tcagtgtctaa ggggtgtggct agtgtttgtg tggaagactg gaataacagg	1320
	aaggaatttg tgtgtactgt gactcacagg gatctgcctt caccacagaa gaaattcatc	1380
	tcaaaaccca atgaggtgca caaacatcca cctgtctgtgt acctgctgcc accagctcgt	1440
	gagcaactga acctgaggga gtcagccaca gtcacctgcc tggatgaaggg cttctctcct	1500
	gcagacatca gtgtgcagtg gcttcagaga gggcaactct tgccccaaga gaagtatgtg	1560
	accagtcccc cgatgccaga gcctggggcc ccaggcttct actttacca cagcatcctg	1620
	actgtgacag aggaggaatg gaactccgga gagacctata cctgtgttgt aggccacgag	1680
	gccctgccac acctgggtgac cgagaggacc gtggacaagt ccactggtaa acccactg	1740
	tacaatgtct ccctgatcat gtctgacaca ggcgccacct gctattga	1788
	<210> 14	
	<211> 595	
	<212> PRT	
	<213> 小家鼠	
	<400> 14	
	Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly	

1	5	10	15
Val Gln Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg	20	25	30
Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Leu Gly Tyr Thr Phe	35	40	45
Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu	50	55	60
Glu Trp Ile Gly Ala Ile His Pro Gly Ser Gly Gly Thr Ala Tyr Asn	65	70	75
Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser	85	90	95
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val	100	105	110
Tyr Tyr Cys Thr Arg Pro Leu Tyr Tyr Arg Tyr Pro Tyr Tyr Phe Asp	115	120	125
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Glu Ser Gln Ser	130	135	140
Phe Pro Asn Val Phe Pro Leu Val Ser Cys Glu Ser Pro Leu Ser Asp	145	150	155
Lys Asn Leu Val Ala Met Gly Cys Leu Ala Arg Asp Phe Leu Pro Ser	165	170	175
Thr Ile Ser Phe Thr Trp Asn Tyr Gln Asn Asn Thr Glu Val Ile Gln	180	185	190
Gly Ile Arg Thr Phe Pro Thr Leu Arg Thr Gly Gly Lys Tyr Leu Ala	195	200	205
Thr Ser Gln Val Leu Leu Ser Pro Lys Ser Ile Leu Glu Gly Ser Asp	210	215	220
Glu Tyr Leu Val Cys Lys Ile His Tyr Gly Gly Lys Asn Arg Asp Leu	225	230	235
			240

[0008]

	His	Val	Pro	Ile	Pro	Ala	Val	Ala	Glu	Met	Asn	Pro	Asn	Val	Asn	Val	
					245					250					255		
	Phe	Val	Pro	Pro	Arg	Asp	Gly	Phe	Ser	Gly	Pro	Ala	Pro	Arg	Lys	Ser	
				260					265					270			
	Lys	Leu	Ile	Cys	Glu	Ala	Thr	Asn	Phe	Thr	Pro	Lys	Pro	Ile	Thr	Val	
			275					280					285				
	Ser	Trp	Leu	Lys	Asp	Gly	Lys	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Phe	Thr	Thr	Asp	
	290						295					300					
	Pro	Val	Thr	Ile	Glu	Asn	Lys	Gly	Ser	Thr	Pro	Gln	Thr	Tyr	Lys	Val	
	305					310					315					320	
	Ile	Ser	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Glu	Ile	Asp	Trp	Leu	Asn	Leu	Asn	Val	
				325						330					335		
	Tyr	Thr	Cys	Arg	Val	Asp	His	Arg	Gly	Leu	Thr	Phe	Leu	Lys	Asn	Val	
				340					345					350			
[0009]	Ser	Ser	Thr	Cys	Ala	Ala	Ser	Pro	Ser	Thr	Asp	Ile	Leu	Thr	Phe	Thr	
			355					360					365				
	Ile	Pro	Pro	Ser	Phe	Ala	Asp	Ile	Phe	Leu	Ser	Lys	Ser	Ala	Asn	Leu	
	370						375					380					
	Thr	Cys	Leu	Val	Ser	Asn	Leu	Ala	Thr	Tyr	Glu	Thr	Leu	Asn	Ile	Ser	
	385					390					395					400	
	Trp	Ala	Ser	Gln	Ser	Gly	Glu	Pro	Leu	Glu	Thr	Lys	Ile	Lys	Ile	Met	
				405						410					415		
	Glu	Ser	His	Pro	Asn	Gly	Thr	Phe	Ser	Ala	Lys	Gly	Val	Ala	Ser	Val	
				420					425					430			
	Cys	Val	Glu	Asp	Trp	Asn	Asn	Arg	Lys	Glu	Phe	Val	Cys	Thr	Val	Thr	
			435					440					445				
	His	Arg	Asp	Leu	Pro	Ser	Pro	Gln	Lys	Lys	Phe	Ile	Ser	Lys	Pro	Asn	
	450						455					460					
	Glu	Val	His	Lys	His	Pro	Pro	Ala	Val	Tyr	Leu	Leu	Pro	Pro	Ala	Arg	

465	470	475	480
Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu Ser Ala Thr Val Thr Cys Leu Val Lys	485	490	495
Gly Phe Ser Pro Ala Asp Ile Ser Val Gln Trp Leu Gln Arg Gly Gln	500	505	510
Leu Leu Pro Gln Glu Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met Pro Glu Pro	515	520	525
Gly Ala Pro Gly Phe Tyr Phe Thr His Ser Ile Leu Thr Val Thr Glu	530	535	540
Glu Glu Trp Asn Ser Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Val Gly His Glu	545	550	555
Ala Leu Pro His Leu Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser Thr Gly	565	570	575
Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val Ser Leu Ile Met Ser Asp Thr Gly Gly	580	585	590
Thr Cys Tyr	595		
<210>	15		
<211>	5		
<212>	PRT		
<213>	人工序列(Artificial Sequence)		
<220>			
<223>	合成肽		
<400>	15		
Asp Tyr Glu Met His	1	5	
<210>	16		
<211>	17		
<212>	PRT		
<213>	人工序列(Artificial Sequence)		
<220>			
<223>	合成肽		
<400>	16		

Ala Ile His Pro Gly Ser Gly Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 17
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成肽

<400> 17

Pro Leu Tyr Tyr Arg Tyr Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 18
<211> 708
<212> DNA
<213> 小家鼠

<400> 18
[0011] atggattttc aggtgcagat tttcagcttc ctgctaata gtcctcagt cataatgtcc 60
agaggacaaa ttgttctcac ccagtctcca gcaatcatgt ctgcatctcc aggggagaag 120
gtcaccatat cctgcagtgc cagctcaagt gtaagttaca tgtactggta ccagcagaag 180
ccaggatcct cccccaacc ctggatttat cgcacatcca acctggcttc tggagtcct 240
gctcgcttca gtggcagtgg gtctgggacc tcttactctc tcacaatcag cagcatggag 300
gctgaagatg ctgccactta ttactgccag cagtatcata gttaccgct caggttcggt 360
gctgggacca agctggagct gaaacgggct gatgctgcac caactgtatc catcttccca 420
ccatccagtg agcagttaac atctggaggt gcctcagtcg tgtgttctt gaacaacttc 480
taccctaaag acatcaatgt caagtgggaag attgatggca gtgaacgaca aaatggcgtc 540
ctgaacagtt ggactgatca ggacagcaaa gacagcacct acagcatgag cagcaccctc 600
acgttgacca aggacgagta tgaacgacat aacagctata cctgtgaggc cactcacaag 660
acatcaactt caccatttgt caagagcttc aacaggaatg agtgtag 708

<210> 19
<211> 235
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 19

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile
20 25 30

Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser
35 40 45

Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
50 55 60

Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
100 105 110

[0012]

His Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
115 120 125

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
130 135 140

Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe
145 150 155 160

Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg
165 170 175

Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser
180 185 190

Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu
195 200 205

Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser
210 215 220

Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
225 230 235

<210> 20
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成肽

<400> 20

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr
1 5 10

[0013] <210> 21
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成肽

<400> 21

Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 22
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成肽

<400> 22

Gln Gln Tyr His Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

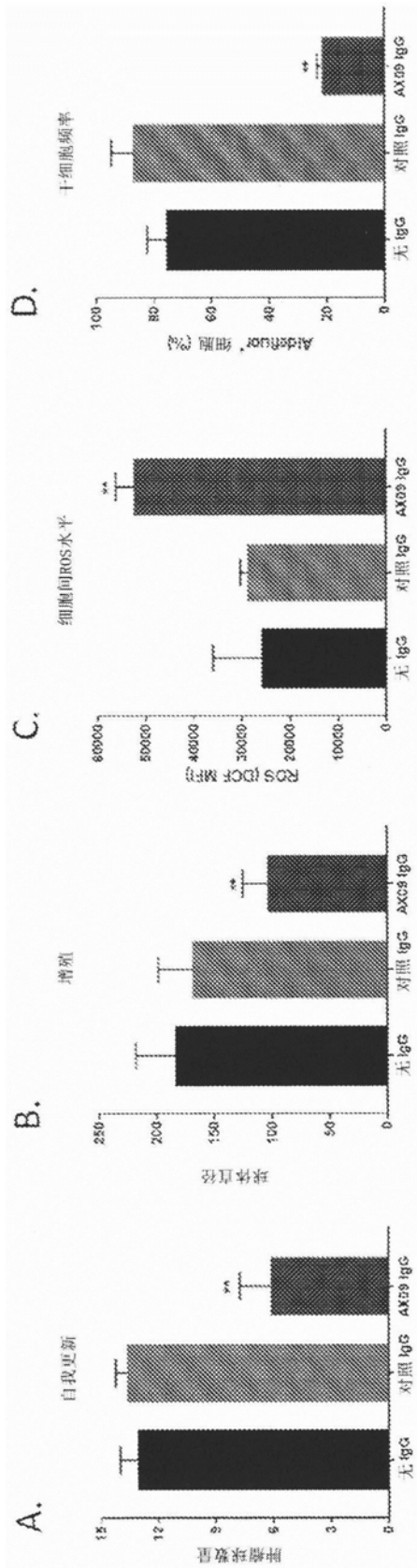


图1

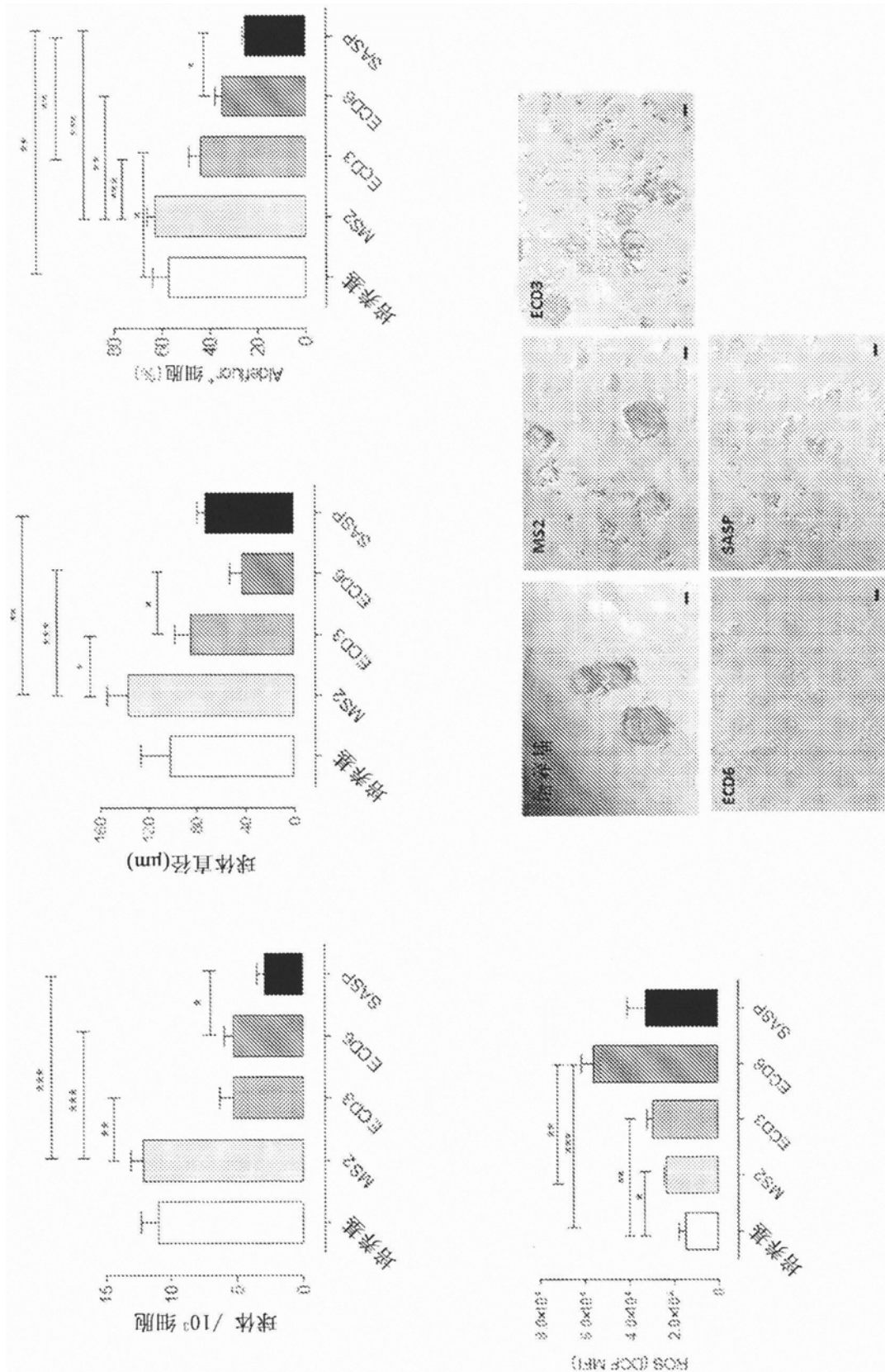


图2

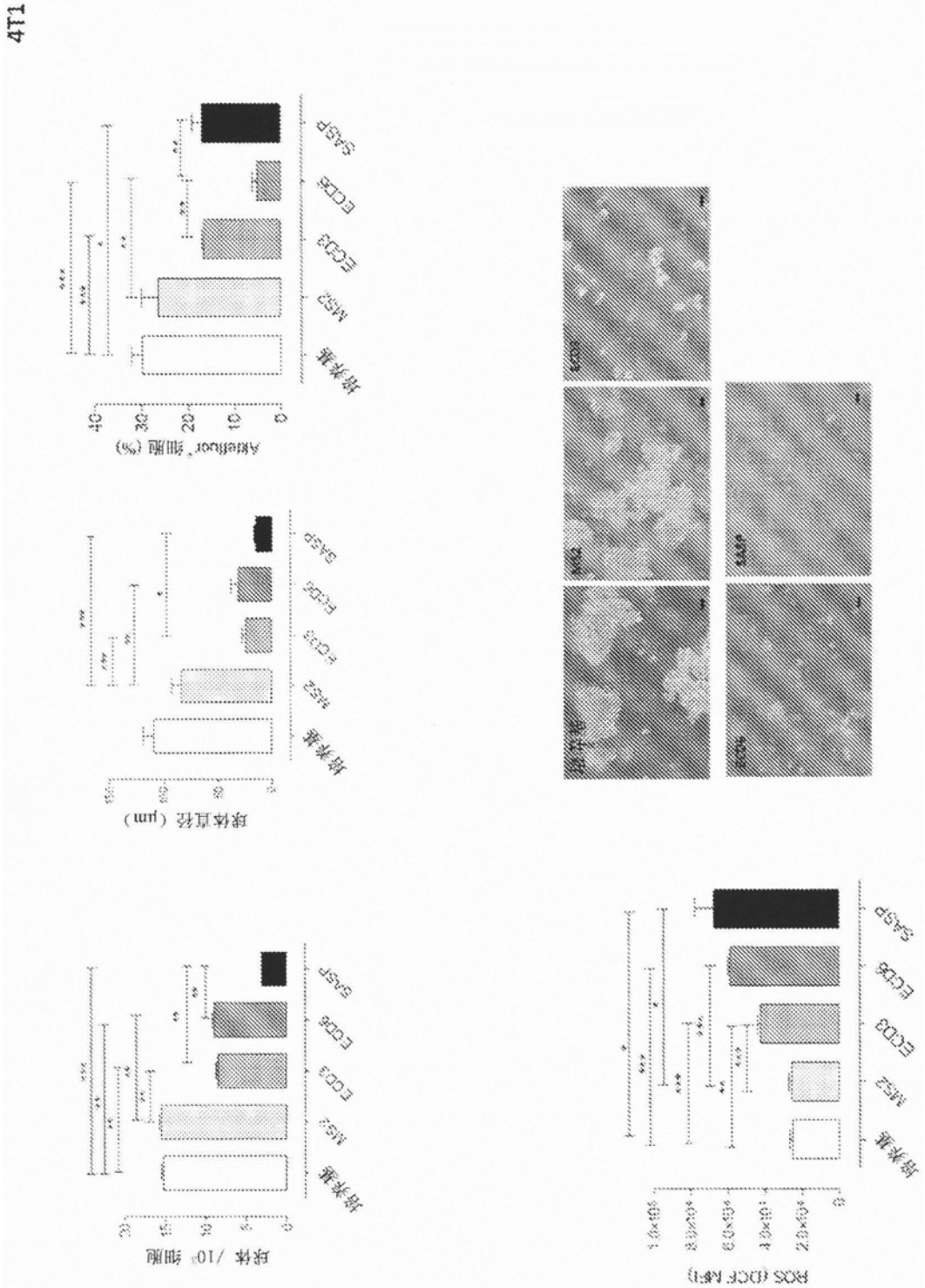


图3

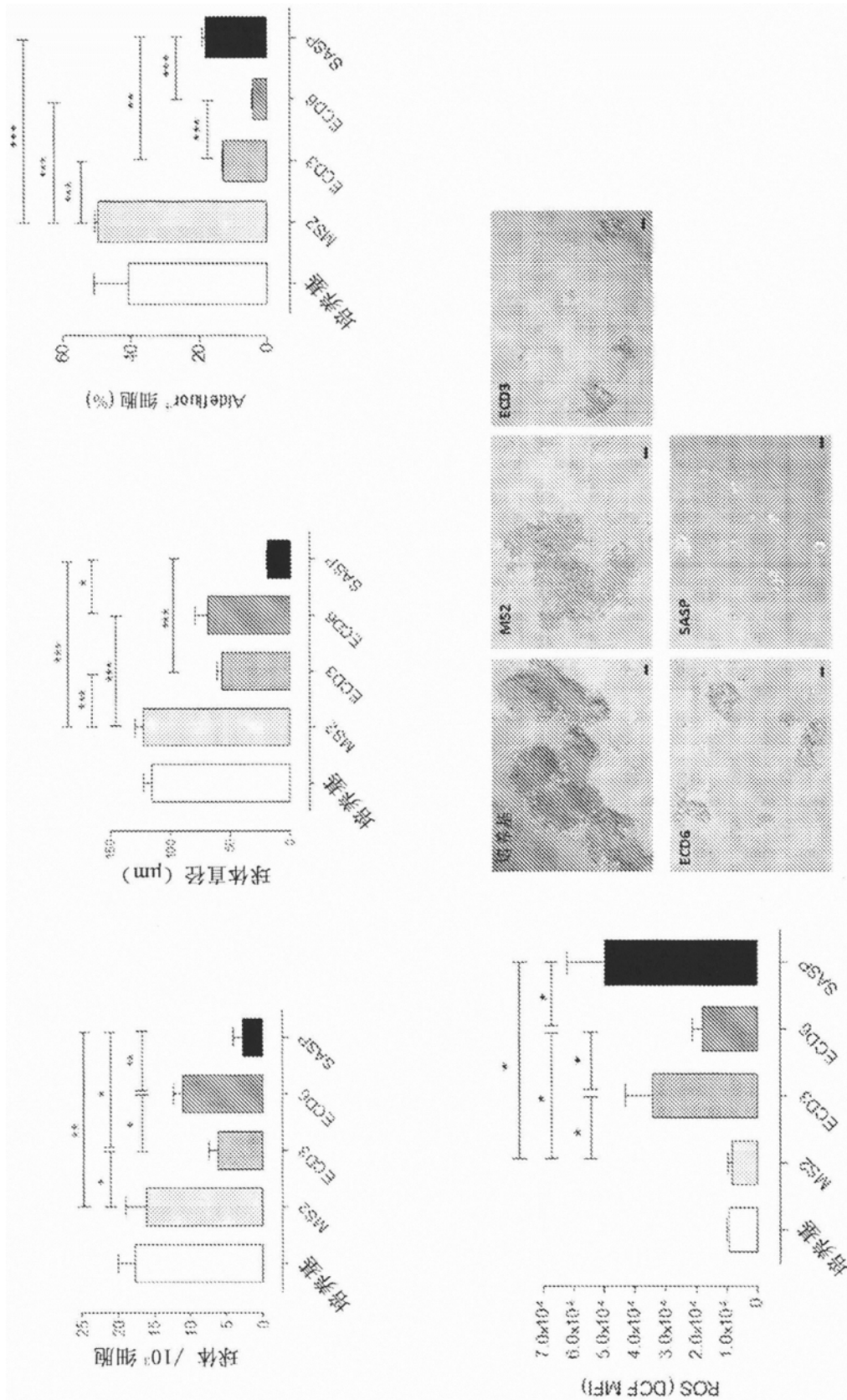


图4

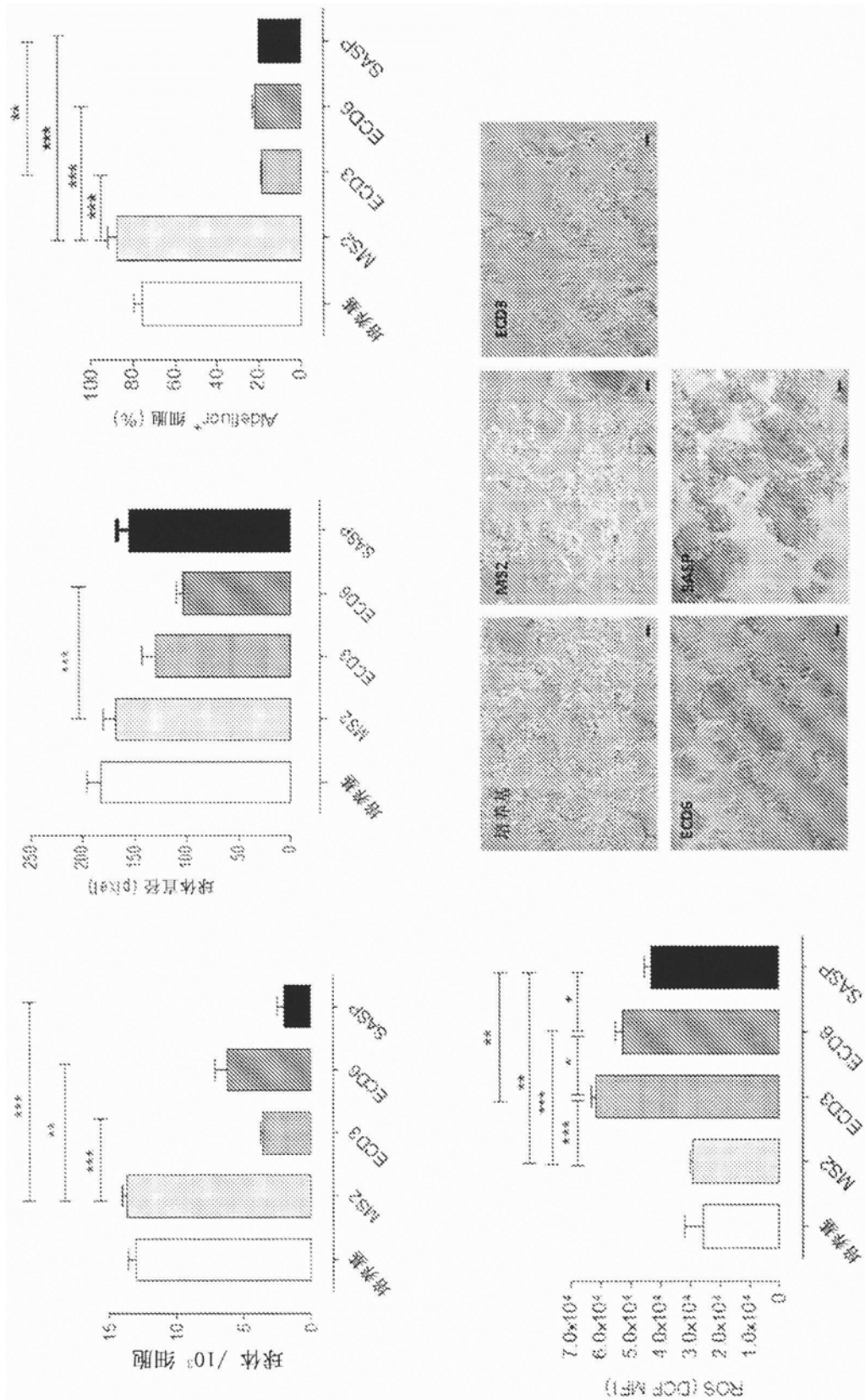


图5

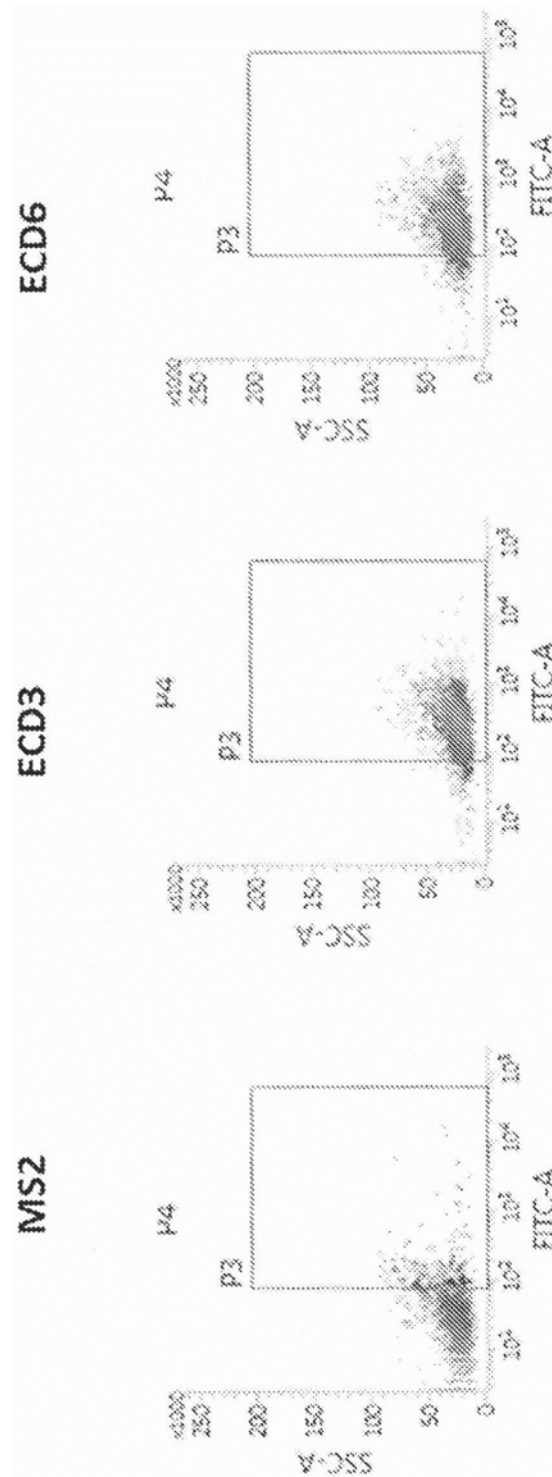


图6

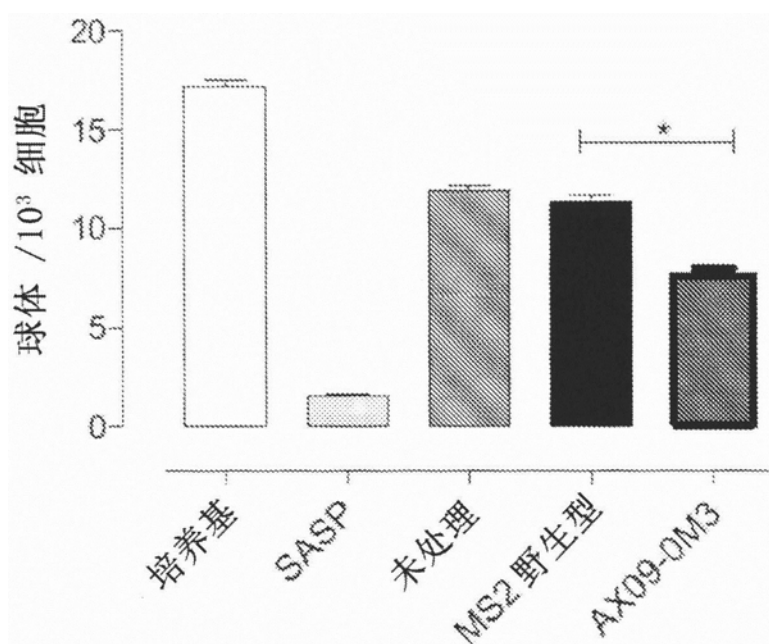


图7

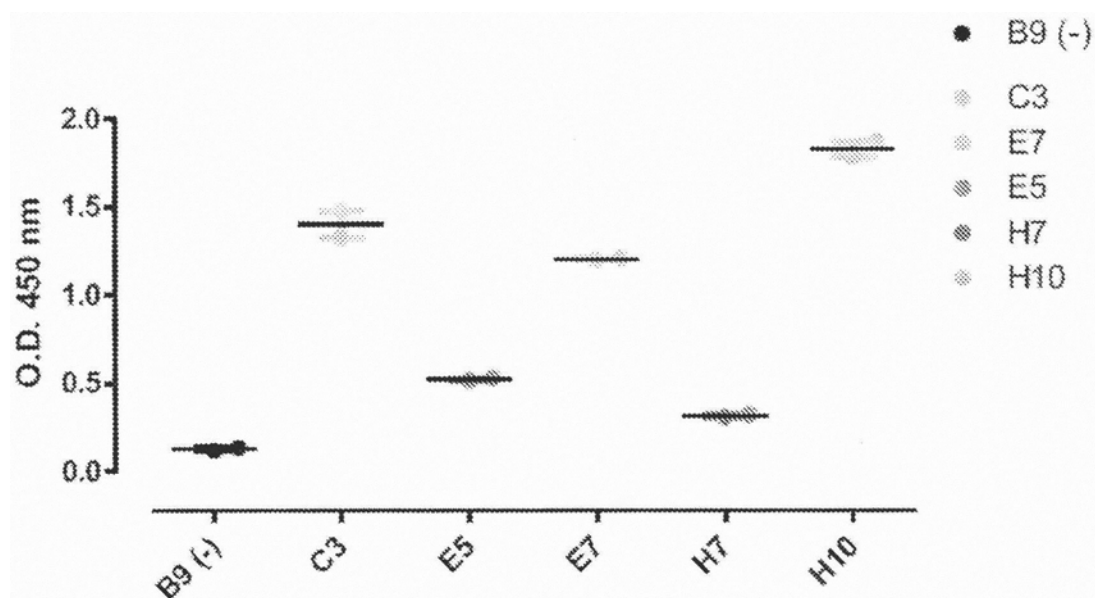


图8

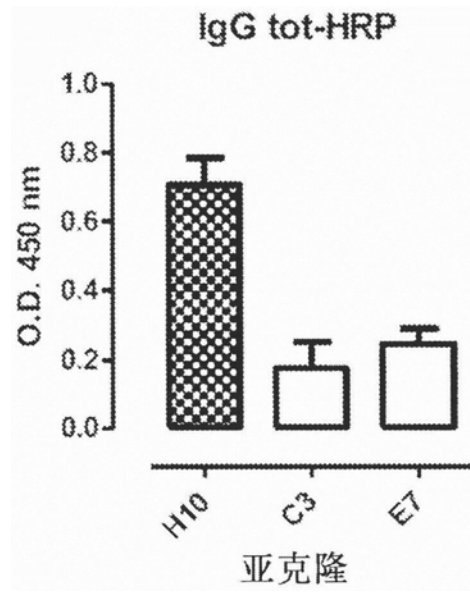


图9

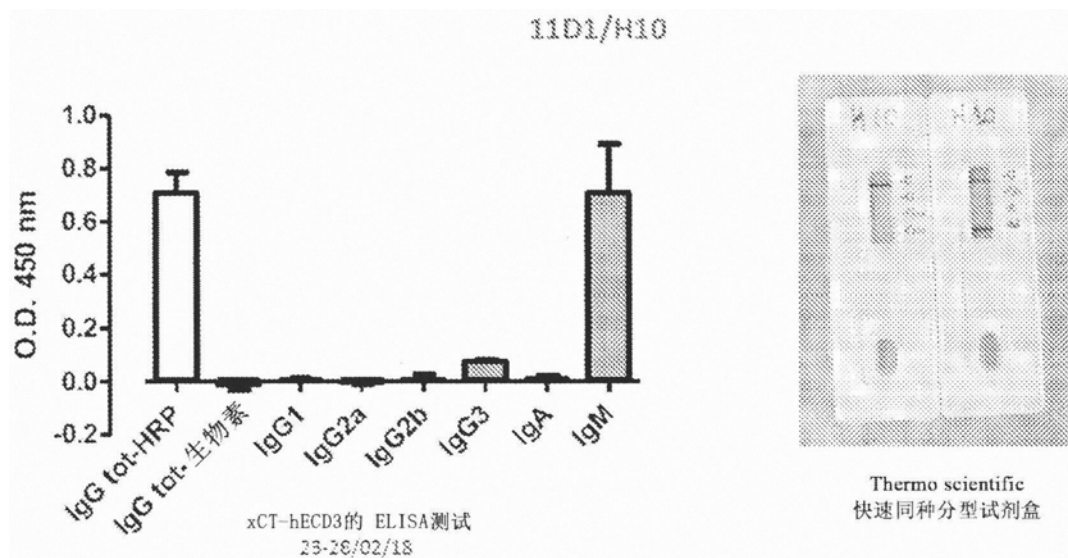


图10

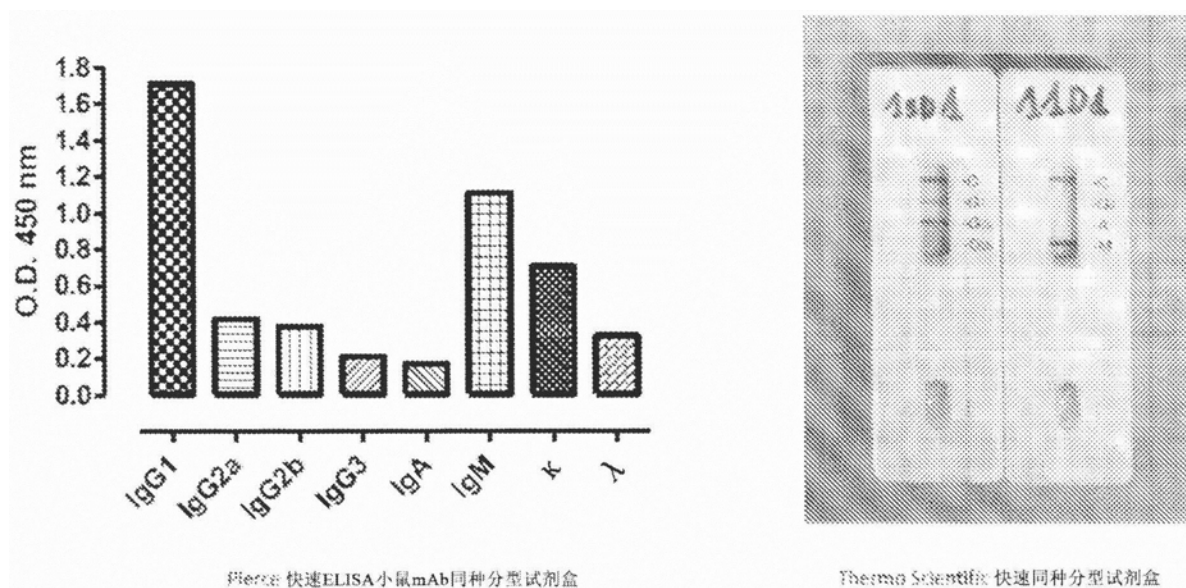


图11

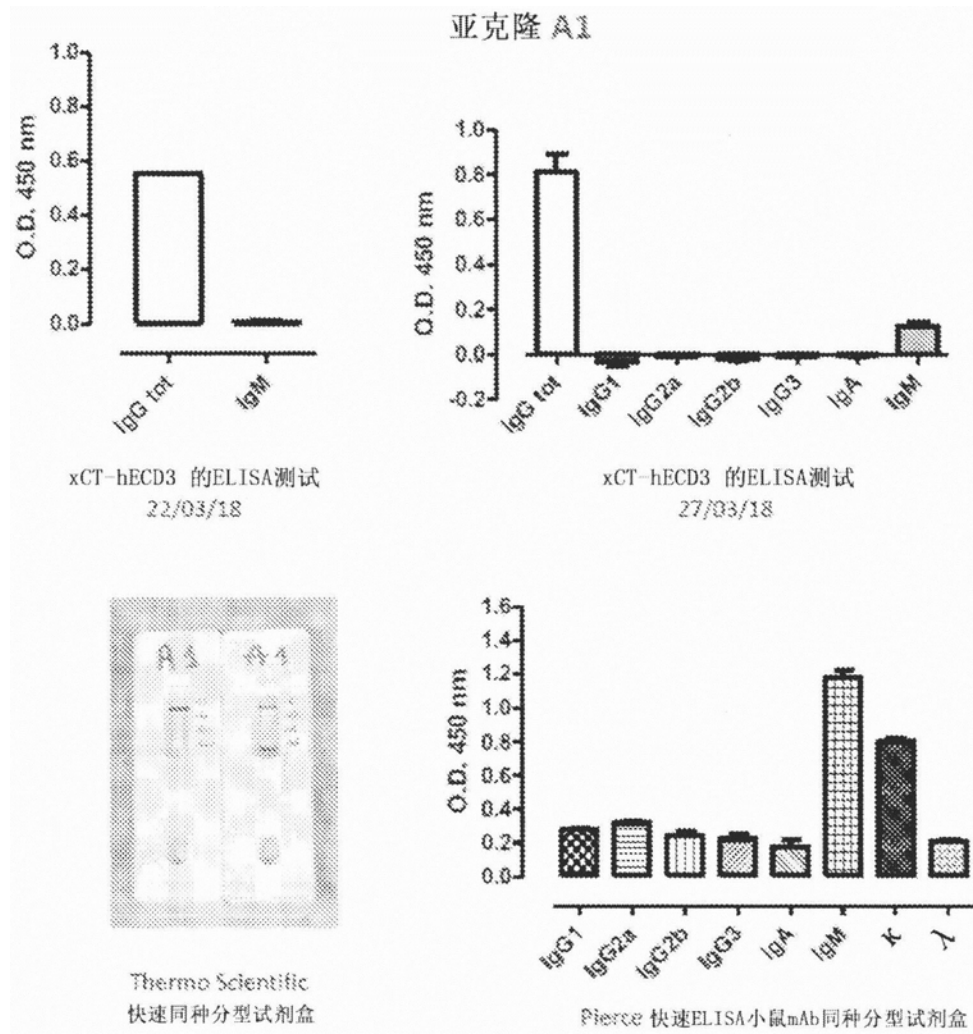


图12

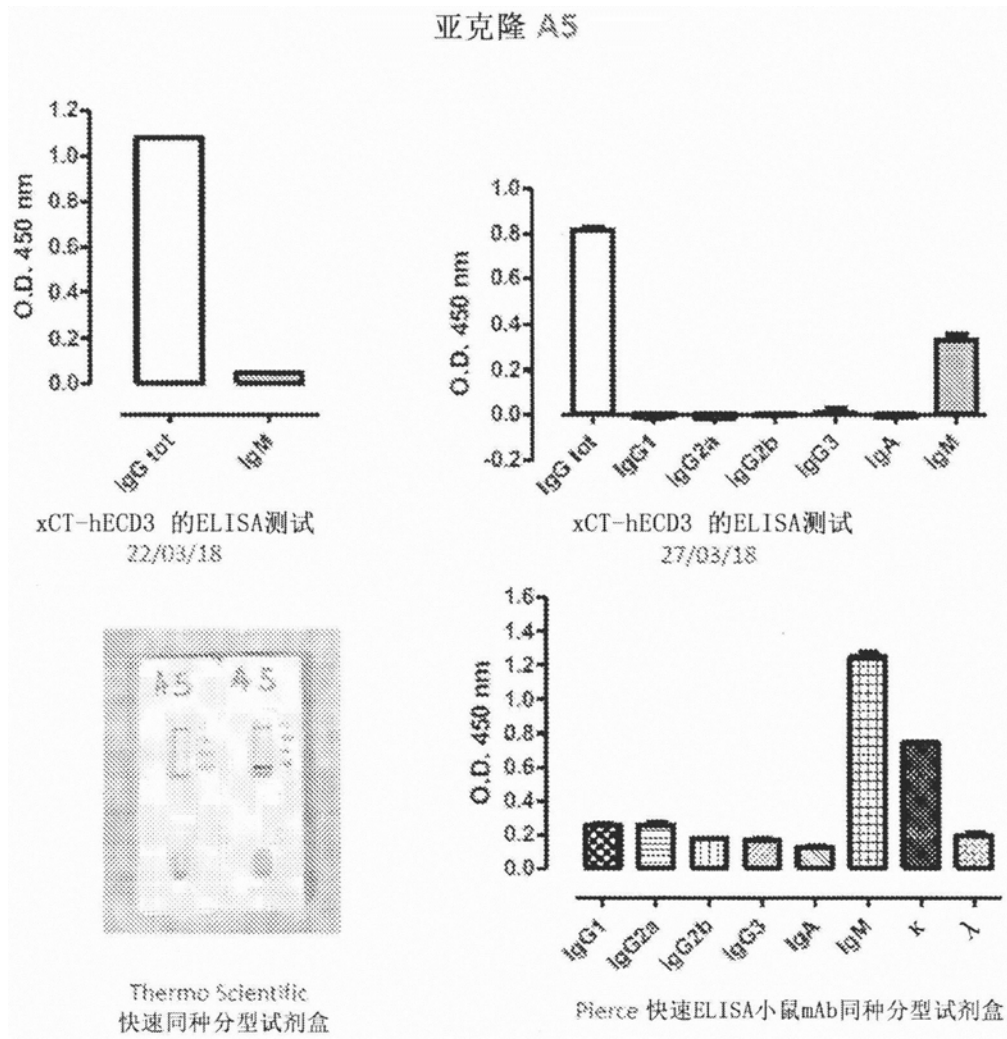


图13

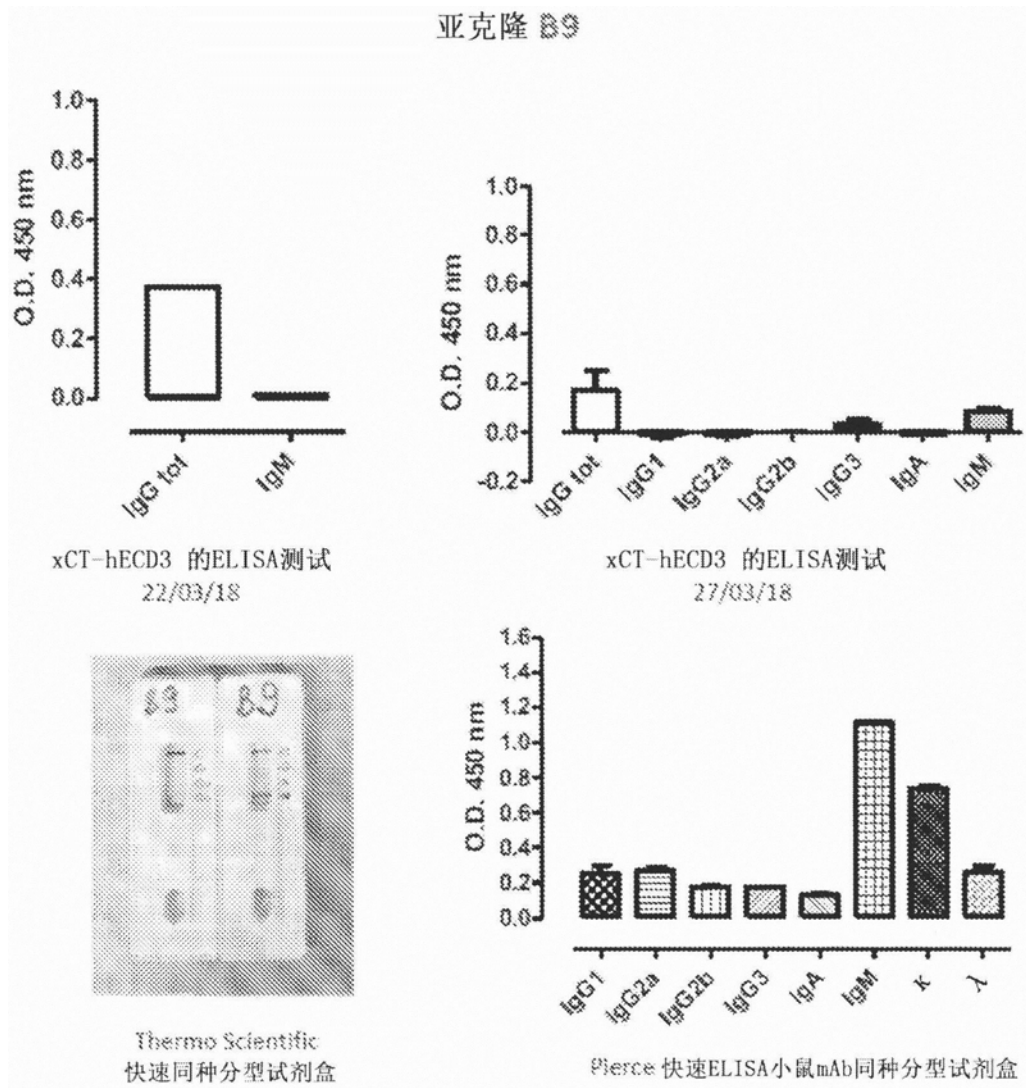


图14

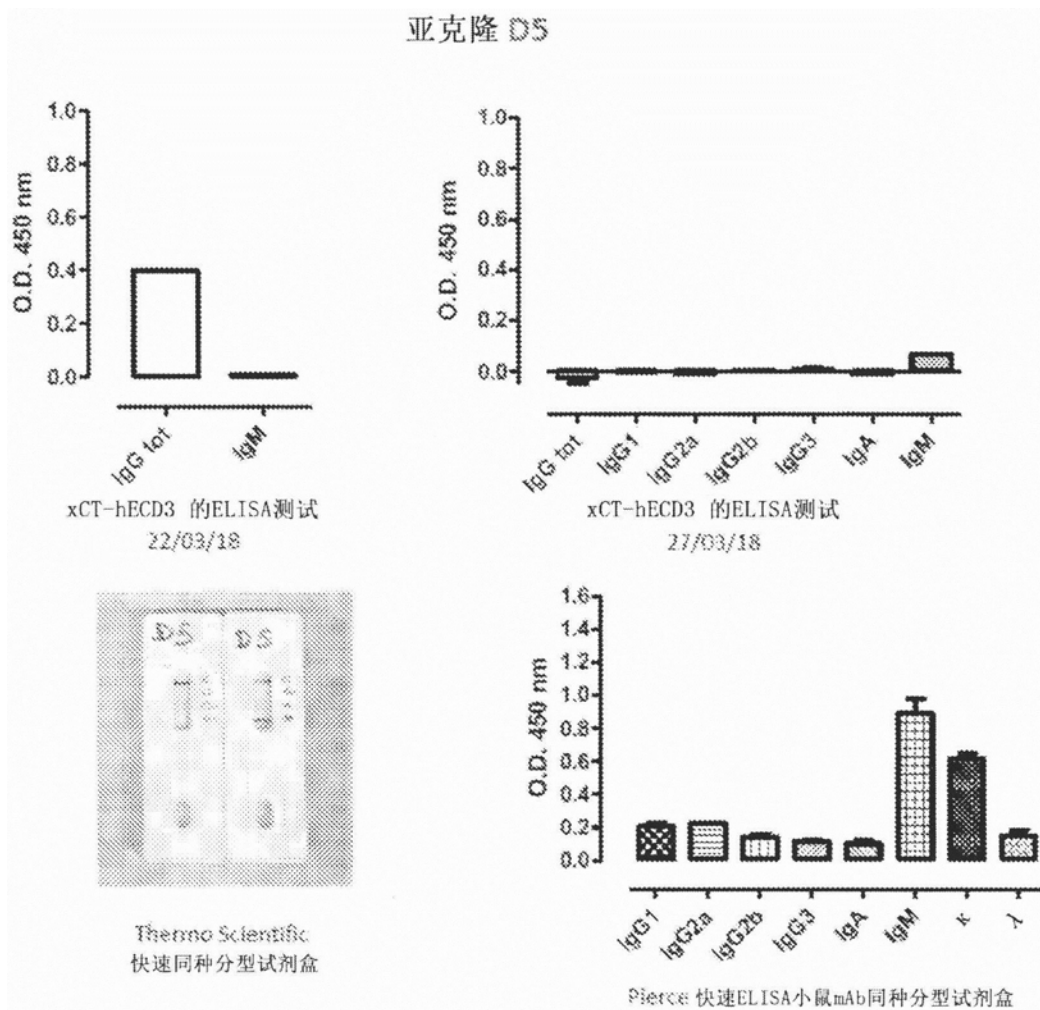


图15

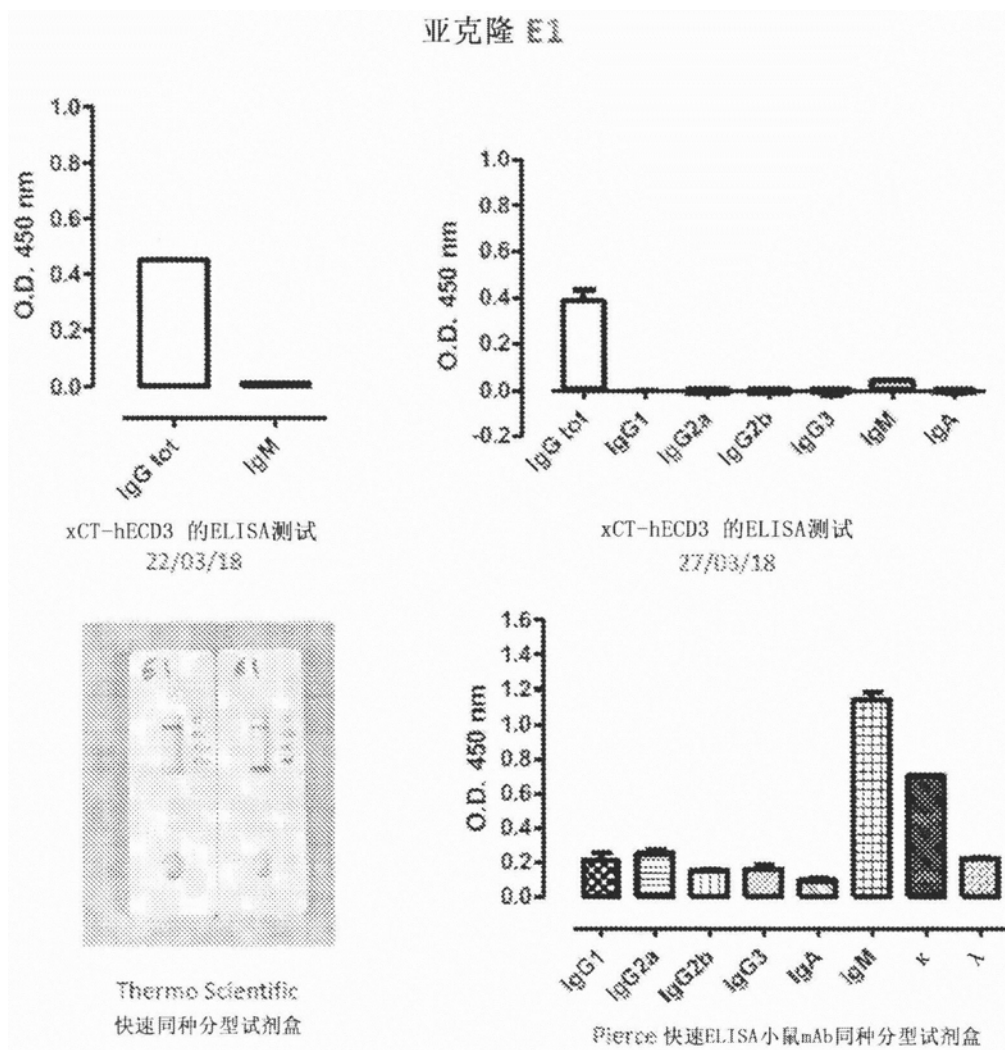


图16